

Molekulare und funktionelle Charakterisierung von Nukleotid-hydrolysierenden Enzymen des Endomembransystems und der Zelloberfläche

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Bernd Uwe Failer
aus Darmstadt

Frankfurt am Main (2002)

vom Fachbereich Biologie und Informatik der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als als Dissertation angenommen

Dekan:	Prof. Dr. Streit
Gutachter:	Prof. Dr. Zimmermann
	Prof. Dr. Volknandt

Datum der Disputation:	3. Februar 2003
------------------------	-----------------

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Herbert Zimmermann für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für das interessante Thema, für seine Anregungen sowie für die stetige Diskussionsbereitschaft.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich Prof. Dr. Walter Volknandt.

Dr. Norbert Braun danke ich für die enorme Diskussionsbereitschaft sowie für die stets guten Anregungen in den letzten Jahre.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Neurochemie danke ich für das stets gute Arbeitsklima sowie für die große Diskussionsbereitschaft. Besonderer Dank gilt auch Dipl. Biologen Peter Brendel für seine Unterstützung während der Aktivitätsmessungen der Ca^{2+} -NDPase.

Prof. Dr. Günther Schmalzing danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung der *Xenopus laevis*-Oocyten-Versuche in seinem Arbeitskreis während seiner Zeit am Institut für Pharmakologie für Naturwissenschaftler an der Johann Wolfgang Goethe-Universität. Den Mitarbeitern seines Arbeitskreises möchte ich für die gute Zusammenarbeit sowie für das gute Arbeitsklima danken.

Meinen Eltern, sowie meiner Frau Heike danke ich für ihre Unterstützung sowie für ihr Verständnis in den letzten nicht immer ganz leichten Jahren.

1	Einleitung	1
1.1	Nukleotide die Bausteine des Lebens	1
1.2	Nukleotide als Extrazelluläre Signalmoleküle	1
1.2.1	P2X-Rezeptoren	2
1.2.2	P2Y-Rezeptoren	3
1.3	ATP als Neurotransmitter	4
1.4	Die E-NTPDase-Familie	5
1.5	Neurotransmitter-Inaktivierung durch lösliche sekretierte Nukleotidasen	8
1.6	Ziele der Arbeit	9
2	Materialien und Methoden	10
2.1	Materialien	10
2.1.1	Geräte	10
2.1.2	Kits und Verbrauchsmaterialien	10
2.1.3	Chemikalien, Medien und Lösungen	11
2.1.4	Detergentien	12
2.1.5	Enzyme	13
2.1.6	Proteaseinhibitoren	13
2.1.7	Oligonukleotide	14
2.1.8	Vektoren und cDNA-Banken	15
2.1.9	Antibiotika	15
2.1.10	Größenstandards	15
2.1.11	Radioaktive Verbindungen	16
2.1.12	Antikörper	16
2.2	Puffer und Lösungen	17
2.3	Methoden	19
2.3.1	Sterilisation von Lösungen und Geräten	19
2.3.2	Bakterienkultur	19
2.3.2.1	Bakterienstämme	19
2.3.2.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	20
2.3.2.3	Anlegen von <i>E.coli</i> -Dauerkulturen	20
2.3.2.4	Herstellung elektrokompenter <i>E.coli</i>	20

2.3.2.5	Bestimmung der Transformationskompetenz	21
2.3.2.6	Elektroporation elektrokompeter <i>E.coli</i>	21
2.3.3	Zellkultur	21
2.3.3.1	Kultivierung von CHO-Zellen	22
2.3.3.2	Zellzahlbestimmung mit Trypanblau	22
2.3.3.3	Transiente Transfektion von CHO-Zellen	23
2.3.3.4	Beschichtung der Deckgläser mit poly-D-Lysin	24
2.3.3.5	Immunzytologie – intrazelluläre Markierung	24
2.3.3.6	Immunzytologie – extrazelluläre Markierung	25
2.3.3.7	Markierung des Golgi-Apparates mit dem Lektin WGA	26
2.3.3.8	Markierung des Zellkerns mit DAPI	26
2.3.3.9	Herstellung grober Membranfraktionen	26
2.3.4	<i>Xenopus laevis</i> -Oocyten	28
2.3.4.1	Haltung und Pflege von <i>Xenopus laevis</i>	28
2.3.4.2	Präparation des Ovars und der Follikelzell-freien Oocyten	28
2.3.4.3	Fetten von Gefäßen	29
2.3.4.4	Heterologe Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oocyten	29
2.3.4.5	Metabolische Markierung mit L- ³⁵ S-Methionin	30
2.3.4.6	Oberflächenmarkierung mit ¹²⁵ Iod	30
2.3.4.7	Reinigung heterolog in Oocyten exprimierter Hexahistidyl-Epitop markierter Proteine über Ni ²⁺ -NTA-Chromatographie	31
2.3.5	Arbeiten mit DNA	32
2.3.5.1	Analytische Plasmidpräparation nach Birnboim und Doly	32
2.3.5.2	Analytische Plasmidpräparation mit NucleoSpin®	33
2.3.5.3	Präparative Plasmidpräparation	34
2.3.5.4	Phenolextraktion	34
2.3.5.5	Ethanol- und Isopropanolfällung	34
2.3.5.6	Bestimmung des Reinheitsgrades und der Konzentration von nukleinsäurehaltigen Lösungen	35
2.3.5.7	Native Agarose-Gelelektrophorese von DNA	36
2.3.5.8	DNA-Extraktion aus Agarose mit NucleoTrap®	36
2.3.5.9	DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen	37
2.3.5.10	5'-Dephosphorylierung von DNA mit CIAP	37

2.3.5.11	5'-Phosphorylierung von DNA mit T4 Polynukleotidkinase	38
2.3.5.12	Ligation von DNA-Fragmenten	38
2.3.5.13	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.3.5.14	Kolonie-PCR	39
2.3.5.15	Amplifikation radioaktiv markierter DNA-Fragmente	40
2.3.5.16	Amplifikation biotinylierter DNA-Fragmente mittels PCR	41
2.3.5.17	Screenen von cDNA-Banken mittels Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde	42
2.3.5.18	ClonCapture® cDNA Selection Kit	43
2.3.5.19	DNA-Sequenzierung nach Sanger	44
2.3.5.20	Konstruktion der Expressionsvektoren	44
2.3.7	Arbeiten mit RNA	46
2.3.7.1	DEPC-Behandlung von Wasser und wäßrigen Lösungen	46
2.3.7.2	Gesamt-RNA-Isolierung mit TRIzol®	46
2.3.7.3	mRNA-Isolierung über Oligo(dT)-Cellulose	47
2.3.7.4	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA	48
2.3.7.5	Northern Blot	49
2.3.7.6	Methylenblau -Färbung geblotteter RNA	50
2.3.7.7	cRNA-Synthese	50
2.3.8	Proteinchemische Methoden	51
2.3.8.1	Proteinbestimmung nach Spector	51
2.3.8.2	Proteinbestimmung nach Peterson	51
2.3.8.3	Diskontinuierliche denaturierende SDS-PAGE	52
2.3.8.4	Blau Native Gelelektrophorese	53
2.3.8.5	Proteinfärbung im PA-Gel mit Coomassie Brilliant Blue R-250	54
2.3.8.6	Western-Blot	55
2.3.8.7	Slot-Blot	56
2.3.8.8	Proteinfärbung auf Nitrocellulosemembranen mit Ponceau S	56
2.3.8.9	Immundetektion immobilisierter Antigene	56
2.3.8.10	Deglycosylierungsanalysen	58
2.3.8.11	Glutardialdehyd-Cross-Linking	58
2.3.9	Aktivitätsmessungen	58

2.3.9.1	Bestimmung von Orthophosphat nach Lanzetta	58
2.3.9.2	Aktivitätsmessungen an intakten Oocyten	59
2.3.9.3	Aktivitätsmessungen mit CHO-Membranfraktionen	60
2.3.9.4	Triton X-114 Präkonditionierung	60
2.3.9.5	Triton X-114 Separation	61
2.3.9.6	Proteinase K/Triton X-100-Assay	61
2.3.10	Computerunterstützte Analysen	62
3.	Ergebnisse	63
3.1	Partielle Klonierung der humanen Ca^{2+} -NDPase	63
3.2	Klonierung, Expression und funktionelle Charakterisierung der Ca^{2+} -NDPase aus <i>Rattus norvegicus</i>	66
3.2.1	Amplifikation und Charakterisierung der ratten Ca^{2+} -NDPase cDNA	66
3.2.1.1	Membrantopologie der Ca^{2+} -NDPase	69
3.2.1.2	Signalpeptidvorhersage der möglichen Translationsprodukte der Ca^{2+} -NDPase	71
3.2.1.3	Beziehung der Ca^{2+} -NDPase zu anderen homologen Sequenzen	72
3.3	Gewebsspezifische Expression der ratten Ca^{2+} -NDPase	77
3.4	Heterologe Expression der C-terminal mit dem Myc-His-Epitop-markierten Ca^{2+} -NDPase in CHO-Zellen	78
3.5	Funktionelle Charakterisierung der Ca^{2+} -NDPase nach heterologer Expression in CHO-Zellen	79
3.5.1	Substratspezifität der Ca^{2+} -NDPase	79
3.5.2	Abhängigkeit der Enzymaktivität von divalenten Kationen	81
3.5.3	pH-Optimum der Enzymaktivität	82
3.5.4	Bestimmung des K_m -Wertes für UDP	83
3.5.5	Ca^{2+} -NDPase ist ein integrales Membranprotein	84
3.5.6	Orientierung des katalytischen Zentrum der Ca^{2+} -NDPase	85
3.6	Zelluläre Lokalisierung der Ca^{2+} -NDPase nach heterologer Expression in CHO-Zellen	86
3.6.1	Oberflächenmarkierung der Ca^{2+} -NDPase nach heterologer Expression in CHO-Zellen	86

3.6.2	Intrazelluläre Lokalisierung der Ca^{2+} -NDPase nach heterologer Expression in CHO-Zellen	87
3.7	Charakterisierung der Quartärstrukturen von NTPDase1 und NTPDase2 der Ratte nach heterologer Expression in <i>Xenopus laevis</i> -Oocyten	90
3.7.1	Funktionelle heterologe Expression der NTPDase1 und NTPDase2 in <i>Xenopus laevis</i> -Oocyten	90
3.7.2	Untersuchung der Quartärstrukturen der NTPDase1 und NTPDase2 nach heterologe Expression in <i>Xenopus laevis</i> -Oocyten mittels SDS-PAGE	92
3.7.3	Untersuchung der Quartärstrukturen der NTPDase1 und NTPDase2 nach heterologe Expression in <i>Xenopus laevis</i> -Oocyten mittels BN-PAGE	93
3.7.4	Änderung der NTPDase2 Substratspezifität mit zunehmender Dauer der heterologen Expression in <i>Xenopus laevis</i> -Oocyten	96
3.7.5	NTPDase1/NTPDase2 Heteromultimere nach heterologer Expression in <i>Xenopus laevis</i> -Oocyten	99
4.	Diskussion	101
4.1	Klonierung, Expression und funktionelle Charakterisierung einer neuen Ca^{2+} -abhängigen NDPase des endoplasmatischen Retikulums	101
4.1.1	Funktionelle Expression der Ca^{2+} -NDPase	102
4.1.2	Ca^{2+} -NDPase: Teil der Qualitätskontrolle im ER	103
4.2	Analyse der Quatärstrukturen von NTPDase1 und 2 nach heterologer Expression in <i>Xenopus laevis</i> -Oocyten	106
4.2.1	Quatärstrukturen der NTPDase1 und NTPDase2	107
4.2.1.1	Quatärstruktur der NTPDase1 der Ratte	107
4.2.1.2	Quatärstruktur der NTPDase2 der Ratte	109
4.2.2	Änderung der NTPDase2 Substratspezifität als Folge der Änderung des multimeren Verteilungsmusters	111
4.2.3	NTPDase1/NTPDase2 Heteromultimere	112

5.	Zusammenfassung	114
A	Anhang	116
A.1	Abkürzungen	116
A.2	Zitate	120
A.3	pNKS2/rnNTPDase1 (4448 bp)	132
A.4	pNKS2/His6rnNTPDase1 (4453 bp)	133
A.5	pNKS2/rnNTPDase2 (4608 bp)	134
A.6	pNKS2/His6-rnNTPDase2 (4611 bp)	135
A.7	BN-PAGE Proteinmarker	137
A.8	PROSITE-Syntax	137

1. Einleitung

1.1 Nukleotide die Bausteine des Lebens

Nukleotide sind grundlegende Bausteine des Lebens. Sie bilden das genetische Alphabet und sind somit in Form der Nukleinsäuren die Träger der genetischen Information. Des weiteren können Nukleinsäuren auch Bestandteile katalytischer Reaktionen sein (z. B. snRNA und rRNA). Nukleotide sind an der Regulation metabolischer Prozesse beteiligt (z. B. über cAMP und cGMP). Darüber hinaus können Nukleotidderivate vielfach als aktiviertes Substrat biosynthetischer Reaktionen fungieren (z. B. Nukleotid-Zucker in Glycosylierungsreaktionen). Und schließlich ist das Nukleotid ATP der universelle Energieüberträger in biologischen Systemen (Übersicht wichtiger biologischer Nukleotidfunktionen in Michal G., 1999).

1.2 Nukleotide als Extrazelluläre Signalmoleküle

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Funktionen können die Nukleotide ATP, ADP, UTP und UDP als extrazelluläre Signalmoleküle fungieren (Zimmermann H. et al., 1998a). Sie sind in sekretorischen und synaptischen Vesikeln, teilweise zusammen mit anderen Signalmolekülen als Kotransmitter, gespeichert und können mittels regulierter Exozytose freigesetzt werden (Zimmermann H., 1994). Ein anderer nicht näher charakterisierter Weg der Nukleotidfreisetzung ist die Freisetzung zytosolischer Nukleotide über Membrankanäle (Zimmermann H., 1996). Nukleotide nehmen als Signalmoleküle, im Vergleich zu anderen Signalmolekülen, eine Sonderstellung ein, denn als grundlegende Bausteine des Lebens werden sie in allen Zellen kontinuierlich synthetisiert. Desweiteren scheinen nahezu alle Zellen des Körpers unterschiedliche Rezeptoren für Nukleotide aufzuweisen. Die Nukleotide vermitteln biologische Antworten durch Aktivierung von P2-Rezeptoren. Diese werden in zwei Klassen unterteilt, die ionotropen P2X-Rezeptoren und die metabotropen P2Y-Rezeptoren (**Abb. 1.2**).

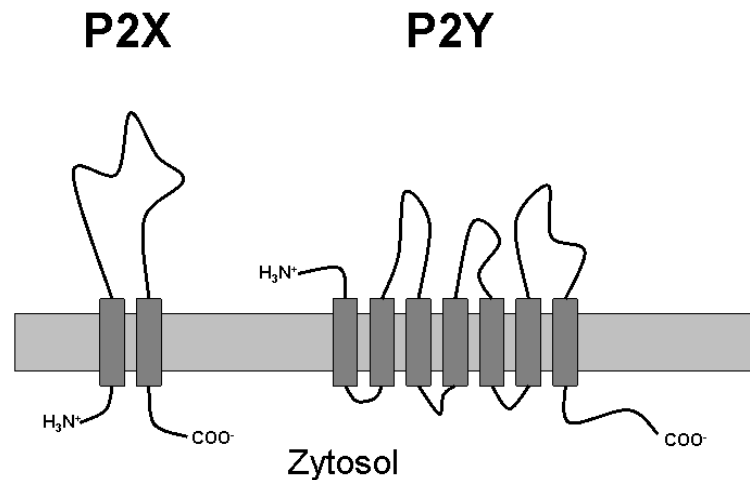


Abbildung 1.2: Unterteilung der P2-Rezeptoren. Die P2-Rezeptoren unterteilen sich in den ionotropen P2X und den metabotropen P2Y-Rezeptor. Der P2Y-Rezeptor ist an ein trimeres G-Protein gekoppelt. Der funktionelle P2X-Rezeptor ist ein Oligomer und bildet einen liganden-gesteuerten Ionenkanal.

1.2.1 P2X-Rezeptoren

Bis heute wurden sieben P2X-Rezeptoruntereinheiten (P2X₁ bis P2X₇) kloniert und charakterisiert (Nörenberg W. et al., 2000; Robertson S.J. et al., 2001). Die Untereinheiten besitzen zwei Transmembrandomänen sowie eine große extrazelluläre Schleife zwischen den beiden Transmembrandomänen. Ein funktioneller P2X-Rezeptor setzt sich aus drei, oder einem Vielfachen von drei, Untereinheiten zusammen (Nicke A. et al., 1998). Alle Untereinheiten, mit Ausnahme des P2X₆, sind in der Lage funktionelle homomultimere Rezeptoren zu bilden. Desweiteren wurden bis heute einige heteromere P2X-Rezeptoren funktionell charakterisiert (P2X_{2/3}, P2X_{4/6}, P2X_{1/5} und P2X_{2/6}). Die P2X-Rezeptoren sind ATP-aktivierte Ionenkanäle. Nach der Aktivierung (EC₅₀ im niedrigen mikromolaren Bereich) öffnen sie sich in wenigen Millisekunden und ermöglichen die schnelle nicht-selektive Passage von Kationen (Na⁺, K⁺, Ca²⁺).

Die P2X₇-Untereinheit weicht von den anderen ab. Sie besitzt einen längeren C-Terminus und ist nicht in der Lage mit anderen Untereinheiten Heteromultimere zu bilden. Des weiteren ist der rekombinate P2X₇-Rezeptor in der Lage sowohl einen Ionenkanal als auch bei höheren ATP-Konzentrationen eine ca. 4 nm große Pore zu formen. Durch diese Pore können dann Moleküle mit einem Molekulargewicht von bis zu 800 D passieren.

1.2.2 P2Y-Rezeptoren

Die P2Y-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Sie besitzen sieben Transmembrandomänen einen extrazellulären N-Terminus sowie einen intrazellulären C-Terminus (von Kügelgen I. et al., 2000). Bis heute wurden zehn P2Y-Rezeptoren kloniert und funktionell charakterisiert. Jedoch sind darunter nur sieben P2Y-Rezeptoren der Säuger (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂ und P2Y₁₃). Die P2Y-Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer Agonistenpräferenz (Agonistenpräferenz der humanen P2Y-Rezeptoren: P2Y₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, ADP; P2Y₂, UTP, ATP; P2Y₄, UTP; P2Y₆, UDP; P2Y₁₁, ATP). P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ und P2Y₁₁ vermitteln ihre Signalantwort über die Aktivierung der Phospholipase C (von Kügelgen I. et al., 2000; Zhang F.L. et al., 2002; Nicholas R.A., 2001). Die Aktivierung der Phospholipase C führt über den Inositolphosphatweg zur Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern sowie zur Aktivierung der Proteinkinase C. Der P2Y₁₁-Rezeptor vermittelt seine Signalantwort zusätzlich zur Phospholipase C-Aktivierung über die Aktivierung der Adenylcyclase. Der P2Y₁₂- sowie der P2Y₁₃-Rezeptor scheinen ihre Signalantwort über die Inhibierung der Adenylcyclase zu vermitteln (Nicholas R.A., 2001; Zhang F.L. et al., 2002). P2Y-Rezeptoren besitzen verschiedene funktionelle Bedeutungen im Organismus. So sind sie unter anderem an der Blutplättchen-Aggregation (P2Y₁ und P2Y₁₂) und der Differenzierung der Zellen des Immunsystems (P2Y₁₁) beteiligt.

1.3 ATP als Neurotransmitter und Neuromodulator

ATP fungiert im zentralen und peripheren Nervensystem als extrazelluläres Signalmolekül. Es vermittelt schnelle exzitatorische synaptische sowie langsame Signale (Cunha R.A. et al., 2000; Nörenberg W. et al., 2000). Desweiteren fungiert ATP als präsynaptischer Modulator der Transmitterfreisetzung (Cunha R.A. et al., 2000). Die ATP-vermittelten schnellen exzitatorischen synaptischen Signale erfolgen durch Aktivierung ionotroper P2X-Rezeptoren (Robertson S.J. et al., 2001). Die Vermittlung langsamer Signale beruht auf der Aktivierung von P2Y-Rezeptoren (von Kűgelgen I. et al., 2000; Nörenberg W. et al., 2000). Die P2-Rezeptoren zeigen eine weite Verteilung im Nervensystem. So konnten alle P2X-Untereinheiten (Robertson S.J. et al., 2001; Nörenberg W. et al., 2000) sowie die P2Y-Rezeptoren P2Y₁, P2Y₂, P2Y₆, P2Y₁₂ und P2Y₁₃ (von Kűgelgen I. et al., 2000; Nicholas R.A., 2001; Zhang F.L. et al., 2002) nachgewiesen werden.

Schnelle ATP-induzierte P2X-vermittelte exzitatorische neuronale Antworten konnten in der medialen Habenula, im Locus coeruleus, im Hypothalamus sowie der CA1-Region des Hippokampus nachgewiesen werden (Robertson S.J. et al., 2001). ATP spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Kommunikation zwischen Neuronen und Gliazellen (Fields R.D. et al., 2000). Die räumliche und zeitliche Wirkung extrazellulär freigesetzter Nukleotide wird durch zelloberflächen ekto-Nukleotidasen reguliert (Zimmermann H., 2000, 1999; Zimmermann H. et al., 1999; Zinchuk V.S. et al., 1999), welche die freigesetzten Nukleotide bis zum Nukleosidmonophosphat umsetzen. Diese sind nun Substrat der Ekto-5'-Nukleotidase, welche die verbliebene Phosphatgruppe abspaltet (Zimmermann H., 2000). Das gebildete Adenosin kann entweder wieder von der Zelle aufgenommen werden oder ebenfalls als Signalmolekül über G-Protein gekoppelte P1-Rezeptoren wirken (Sebastiao A.M. et al., 2000). Die ekto-Nukleotidasen NTPDase1 und NTPDase2, der E-NTPDase-Familie, konnten im Nervensystem nachgewiesen werden (Kegel B. et al., 1997; Wang T.F. und Guidotti G., 1998b). Daher erfolgt die Signaltermination, durch Hydrolyse der Nukleotide, vermutlich durch Mitglieder der E-NTPDase-Familie.

1.4 Die E-NTPDase-Familie

Bis heute sind sieben Mitglieder der E-NTPDase-Familie kloniert und funktionell charakterisiert worden. Die Mitglieder dieser Familie sind in der Lage Nukleosid 5'-Tri- und Diphosphate zu hydrolysieren, wobei sie Orthophosphat freisetzen (Zimmermann H., 2000). Alle Mitglieder der Familie haben 5 konservierte Bereiche (ACR – Apyrase conserved regions) und enthalten das β - und γ -Phosphat Bindungsmotiv der Actin-Hsp70-Hexokinase-Superfamilie (Smith T.M. et al., 1999a; Zimmermann H., 2000). Die Substratspezifitäten der einzelnen Mitglieder der Familie unterscheiden sich voneinander (**Abb. 1.4.1**). Die Mitglieder der E-NTPDase-Familie lassen sich in drei Gruppen unterteilen (**Abb. 1.4.1 und Abb. 1.4.2**).

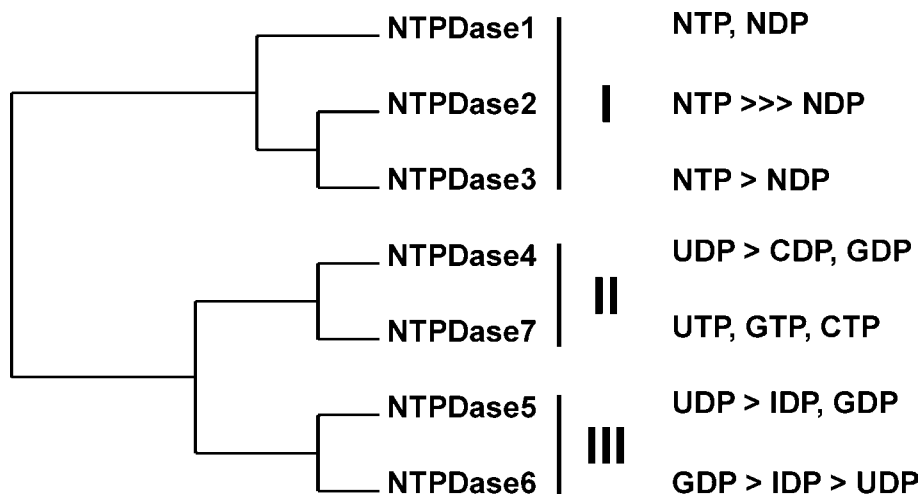


Abbildung 1.4.1: Dendrogramm der E-NTPDase-Familie. Dendrogramm der humanen Mitglieder der E-NTPDase-Familie. Die Mitglieder der Familie lassen sich in drei Gruppen unterteilen: I, Membranprotein der Zelloberfläche; II, intrazelluläres Membranprotein; III, intrazelluläres Membranprotein sowie lösliche Isoform. Die Substratpräferenzen wurden angegeben.

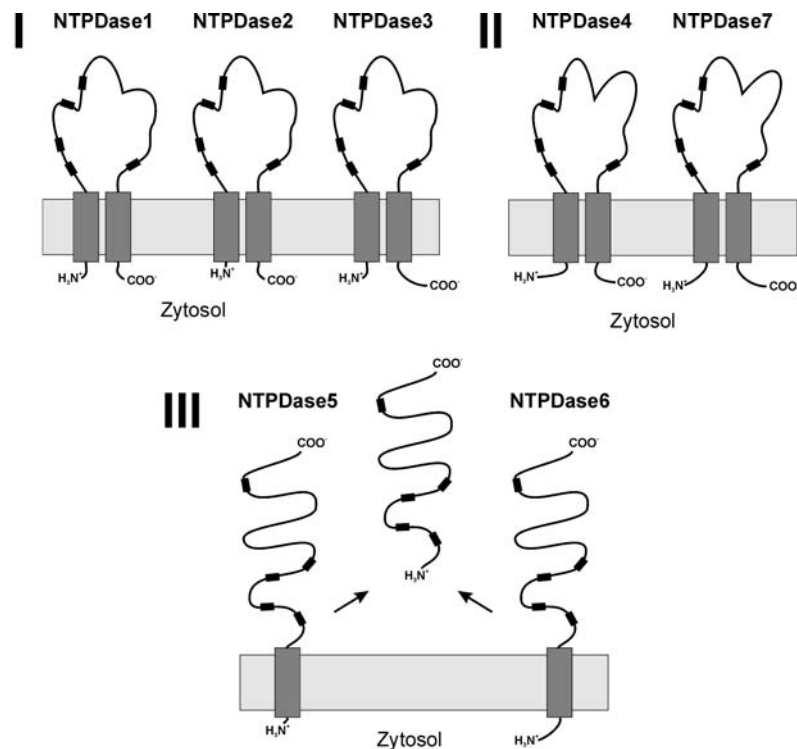


Abbildung 1.4.2: Membrantopologie der Mitglieder der E-NTPDase-Familie. Die Mitglieder der E-NTPDase-Familie unterscheiden sich in ihrer Membrantopologie und der zellulären Lokalisierung. I, zwei Transmembrandomänen, Zelloberfläche; II, zwei Transmembrandomänen, intrazellulär; III, eine Transmembrandomäne, intrazellulär, sowie lösliche sekretierte Isoform. Die fünf Apyrase-konservierten Bereiche wurden schematisch angezeigt.

Die erste Gruppe umfasst die Zelloberflächen-lokalisierten NTPDase1 – 3 (Heine P. et al., 1999; Smith T.M. und Kirley T.L., 1998). Diese komplex glycosylierten Enzyme besitzen jeweils eine Transmembrandomäne an ihrem N- bzw. C-Terminus, sowie eine große extrazelluläre Domäne zwischen den Transmembrandomänen (Kegel B. et al., 1997; Kirley T.L., 1998). Diese Membrantopographie ist für ekto-Enzyme ungewöhnlich, da diese meist nur durch eine Transmembrandomäne oder durch Verknüpfung mit einem Lipid in der Plasmamembran verankert sind (Semenza G., 1986). In ihrer Membrantopographie stimmen die NTPDasen 1 – 3 mit den Untereinheiten der ionotropen P2X-Rezeptoren überein, welche in der Lage sind Homo- und Heteromultimere zu bilden (Nicke A. et al., 1998; Robertson S.J. et al., 2001). Die NTPDase1 – 3 sind ebenso wie die P2X-Untereinheiten in der Lage Homomultimere zu bilden. So wurde für den nativen Zustand der NTPDase1 der Ratte ein Tetramer postuliert (Wang T.F. et al., 1998). Für die NTPDase2 des Huhns sowie für die humane NTPDase3 wurde das „Dimer-Dimer“-Modell postuliert (Caldwell C.C. et al., 2001; Murphy D.M. et al., 2002). Desweiteren scheinen die

Transmembrandomän-vermittelten Multimerstrukturen für die katalytische Aktivität von Bedeutung zu sein. So beruht die Inaktivierung der NTPDase1 durch Triton X-100-Solubilisierung auf der dissoziativen Wirkung dieses Detergenz, wodurch nur monomeres Enzym erhalten wird (Wang T.F., Ou Y. und Guidotti G., 1998). Die aktivitätssteigernde Wirkung von Cross-Linkern auf die NTPDase2 wurde durch eine Erhöhung der Multimerstrukturen erklärt (Kirley T.L. et al., 1999).

Die NTPDasen 1 – 3 sind an der Beendigung Nukleotid-vermittelter Signale, durch Nukleotidhydrolyse, beteiligt. Während die NTPDase1 keine Nukleotid-Präferenz zeigt, weisen die NTPDase3 eine starke und die NTPDase2 eine noch stärkere Präferenz für Nukleosid-5'-triphosphate auf. Daher sind oberflächlich lokalisierte NTPDasen nicht nur in der Lage ein Nukleotidsignal zu beenden. Sie können aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifität ein solches Signal auch modulieren (Kennedy C. et al., 1996). Alle Plasmamembranproteine beginnen ihre Biosynthese im endoplasmatischen Retikulum und werden über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Prinzipiell könnten die NTPDase1 – 3 während dieses Weges an die Zelloberfläche für die Zelle ein Problem darstellen, wenn sie intrazellulär aktiv wären. Denn ATP ist der wichtigste Energielieferant für biologische Synthesen in ER und Golgi. Es konnte jedoch zumindest für die NTPDase1 gezeigt werden, dass sie intrazellulär nicht aktiv ist, sondern ihre Aktivität erst nach vollständiger Glycosylierung an der Zelloberfläche erhält (Zhong X. et al., 2001).

Die Mitglieder der zweiten und dritten Gruppe sind intrazellulär lokalisiert, wobei im Falle der dritten Gruppe zusätzlich eine lösliche sekretierte Isoform existiert. Die Mitglieder der zweiten Gruppe, die NTPDase4 und die NTPDase7, besitzen ebenfalls zwei Transmembrandomänen und eine große luminale Domäne zwischen beiden Transmembrandomänen. Die NTPDase5 und 6 bilden die dritte Gruppe. Diese Enzyme besitzen, im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Familie, nur eine Transmembrandomäne nahe des N-Terminus, sowie einen langen luminalen C-Terminus. Für beide Enzyme wurden lösliche teilweise sekretierte Isoformen beschrieben (Trombetta E.S. und Helenius A., 1999; Mulero J.J. et al., 2000, 1999; Braun N. et al., 2000a). Keines der intrazellulär lokalisierten Mitglieder der NTPDase-Familie zeigt eine signifikante Substratspezifität für ATP und ADP.

NTPDase4 (Wang T.F. und Guidotti G., 1998a) und NTPDase6 (Braun N. et al., 2000a) wurden im Golgi-Apparat lokalisiert, die NTPDase5 (Trombetta E.S. und Helenius A., 1999) im ER. Die NTPDase7 liegt in nicht näher charakterisierten intrazellulären vesikulären Kompartimenten vor (Shi J.D. et al., 2001).

1.5 Neurotransmitter-Inaktivierung durch lösliche sekretierte Nukleotidasen

Zur Hypothese der Neurotransmitter-Inaktivierung durch Nukleotid-Hydrolyse mittels zelloberflächenständiger Ekto-Nukleotidasen kommt ein weiteres Modell hinzu. Stimulierte sympathische Fasern des Vas deferens sekretieren nicht nur ATP sondern auch eine lösliche, bisher nicht näher charakterisierte ATP und/oder ADP hydrolysierende Nukleotidase (Kennedy C. et al., 1997). Da jedoch keine der bekannten löslichen sekretierten E-NTPDasen eine signifikante ATP- oder ADP-Hydrolyse aufzeigen, handelt es sich bei der im Vas deferens sekretierten Nukleotidase entweder um ein neues Mitglied der E-NTPDase-Familie oder um eine andere bisher unbekannte Nukleotidase.

In den Speicheldrüsen blutsaugender Insekten, in der Bettwanze *Cimex lectularius* sowie in den Sandfliegen *Phlebotomus papatasi* und *Lutzomyia longipalpis*, wurden lösliche sekretierte ATP und ADP-hydrolysierende Nukleotidasen (Apyrasen) entdeckt (Valenzuela J.G. et al., 1998, 2001; Charlab R. et al., 1999). Diese sollen die Blutaufnahme dieser Insekten unterstützen, indem sie die ADP-induzierte Blutplättchenaggregation durch ATP- und ADP-Hydrolyse unterdrücken (Mans B.J. et al., 2000). Die Aktivität dieser Enzyme zeigte eine strikte Abhängigkeit von Calciumionen.

Nach heterologer Expression der Apyrase der Bettwanze in Säugerzellen konnte eine sekretierte Calcium-abhängige Apyraseaktivität nachgewiesen werden (Valenzuela J.G. et al., 1998). Die Apyrase von *Cimex lectularius* zeigte keine Sequenzhomologien zur E-NTPDase-Familie oder anderen Nukleotid-spaltenden Enzymen. In den Sequenzdatenbanken fanden sich jedoch Bruchstücke homologer

RNA-Sequenzen des Menschen und der Maus. Daher bestand die Möglichkeit, dass die homologen Enzyme der Säuger eine sekretierte Nukleotidase (Kennedy C. et al., 1997) darstellen.

1.6 Ziele der Arbeit

Die Bettwanze *Cimex lectularius* und die Sandfliegen *Phlebotomus papatasi* sowie *Lutzomyia longipalpis* exprimieren eine eigenständige lösliche sekretierte ATP- und ADP-hydrolysierende Nukleotidase (Valenzuela J.G. et al., 1998, 2001). In den Sequenzdatenbanken des Menschen und der Maus wurden homologe Bruchstücke nachgewiesen (Valenzuela J.G. et al., 1998). Dies deutete auf die Existenz eines zu den Insektenenzymen homologen Enzyms der Säuger hin. Somit bestand die Möglichkeit, dass auch Säuger eine sekretierte Apyrase exprimieren. In der vorliegenden Arbeit wurde daher das Homologe der Ratte kloniert und funktionell charakterisiert.

NTPDase1 und 2 besitzen jeweils eine Transmembrandomäne an ihrem N- sowie C-Terminus (Kegel B. et al., 1997). Der größte Teil der Proteine sowie ihre katalytische Domäne liegen auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran zwischen den beiden Transmembrandomänen (Heine P. et al., 1999). Die Multimerstrukturen von NTPDase1 und 2 wurden bisher anhand von Membranfraktionen nach heterologer Expression untersucht (Wang T.F., Ou Y. und Guidotti G., 1998; Kirley T.L. et al., 1999). Für beide Enzyme wurden Quartärstruktur-abhängige Änderungen der Aktivität beschrieben. Geht man für diese Untersuchungen von Membranfraktionen aus können die Multimerstrukturen sowohl auf den zelloberflächen als auch den intrazellulären Pool der Enzyme zurückzuführen sein. Daher wurden im zweiten Teil der Arbeit die Quartärstruktur der NTPDase1 und NTPDase2 nach metabolischer sowie erstmals nach Oberflächenmarkierung analysiert. Dies erfolgte mit Hilfe von Protein-Vernetzungsversuchen und der Blau-Nativen-Gelelektrophorese. Da NTPDase1 und 2 eine den P2X-Untereinheiten ähnliche Membrantopologie aufweisen und da diese Heterooligomere ausbilden können, wurde die mögliche Existenz eines NTPDase1/NTPDase2-Heteromultimers untersucht.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

ElectroCell Manipulator ECM600	BTX, San Diego, CA, USA
Kodak EDAS 290	Eastman Kodak, Stuttgart, Deutschland
Mikroinjektor Nanoject	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Mikropipetten Puller PP-830	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Minifold II	Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland
Semi-Dry-Blotter „PEGASUS“	PHASE, Lübeck, Deutschland
Thermocycler :	
Primus	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
T-Gradient	Biometra, Göttingen, Deutschland

2.1.2 Kits und Verbrauchsmaterialien

Advantage [®] cDNA PCR-Kit	Clontech, Heidelberg, Deutschland
Biomax MR Röntgenfilm	Eastman Kodak, Stuttgart, Deutschland
Biomax MS Röntgenfilm	Eastman Kodak, Stuttgart, Deutschland
CELL+, Petrischalen für Oocyten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Chill-out 14 Liquid PCR Wax	MJ Research Inc., Watertown, MA, USA
ClonCapture [®] cDNA Selection Kit	Clontech, Heidelberg, Deutschland
ECL [®]	Amersham Pharmacia, Braunschweig, Deutsch.
ECL+ [®]	Amersham Pharmacia, Braunschweig, Deutsch.
Elektroporationsküvette (1 mm)	peqlab, Erlangen, Deutschland
Elektroporationsküvette (4 mm)	peqlab, Erlangen, Deutschland
Hyperfilm ECL [®]	Amersham Pharmacia, Braunschweig, Deutsch.
Immobilon-P [®]	Millipore, Eschborn, Deutschland

NucleoBond® AX500	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin®	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoTrap®	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
PROTRAN BA85	Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland
Sepharose G50	Stratagene, Heidelberg, Deutschland

2.1.3 Chemikalien, Medien und Lösungen

ADP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
AMP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
ATP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Biotin-21-dUTP	Clontech, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
CDP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
CTP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Coomassie brilliant blue G-250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Coomassie brilliant blue R-250	Serva, Heidelberg, Deutschland
DABCO	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
DAPI	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Fötales Rinderserum	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Folin-Ciocalteu Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland
GMP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
GDP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
GTP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Ham's F12	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
IDP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
ITP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Mowiol	Aventis, Frankfurt, Deutschland
Ni ²⁺ -NTA-Agarose Beads	Qiagen, Hilden, Deutschland
Oligo(dT)-Cellulose	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2. Materialien und Methoden

Pferdeserum	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Polyvinylpyrrolidon	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Roti-Phenol [®]	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sulfo-SSHP	Pierce, Rockford, IL, USA
TEMED	Merck, Darmstadt, Deutschland
TRIzol [®]	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
UMP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
UDP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
UTP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Standardchemikalien und Lösungsmittel wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) und Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.1.4 Detergentien

Digitonin (wasserlöslich)	Serva, Heidelberg, Deutschland Calbiochem, Schwalbach, Deutschland Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Lithiumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Nonidet NP40	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Octylglucosid	Roche, Mannheim, Deutschland
Triton X-100	Serva, Heidelberg, Deutschland
Triton X-114	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

2.1.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Endo H	New-England Biolabs, Schwalbach, Deutschland
Kollagenase	Serva, Heidelberg, Deutschland
PNGase F	New-England Biolabs, Schwalbach, Deutschland
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
RNase A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
SAWADY Pwo DNA Polymerase	peqlab, Erlangen, Deutschland
S1 Nuclease	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
SP6-RNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
T4 Polynukleotidkinase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Taq DNA Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland, Qiagen, Hilden, Deutschland Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.6 Proteaseinhibitoren

PMSF	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Chymostatin	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
Pepstatin	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
Benzamidin	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
Antipain	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
Leupeptin	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
Pefabloc SC	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aprotinin	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland

2.1.7 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden bei BioSpring (Oberursel, Deutschland) synthetisiert:

3ATGsrapy	5'-TGA ATT CCA GTG CTG GCA TCC ATG ACC-3'
AES-6His-A	5'-GTA CCG ATA TCA CCA TGC ACC ACC ACC ACC ACC ACG-3'
AES-6His-B	5'-TCG ACG TGG TGG TGG TGG TGG TGC ATG GTG ATA TCG-3'
BGHrev	5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'
Cimex1	5'-TAC CAG ATC GAA GGC AGC AA-3'
Cimex2	5'-GCA GGC AGA CTC ATG GAT GA-3'
Cimex3	5'-TTT GCT GCC TTC GAT CTG G-3'
Cimex4	5'-CAA TCA GGT CGG ATA GCT CC-3'
Cimex5	5'-AAT GGA ATG AGT CTA TGC ACT C-3'
Cimex6	5'-GAA CTA AGA TGT GAC TGG-3'
Cimex7	5'-TGC TGT GGA AAG ACT TCA CG-3'
Cimex8	5'-CTG TCT GTC ACG CTG ATG CC-3'
CimexA	5'-CGG GTG ATG TGG TGA ACG AG-3'
CimexB	5'-AAC GGA AAC ACT GAG CAA GG-3'
CimexC	5'-ATA AAA CCA TCT CCG CAT C-3'
CimexD	5'-AGA CCC AGG TTA GGC ACG AC-3'
N-Sall-CR1	5'-ATG TCG ACC AGC GGG AAT GGA ATG AGC-3'
pCMV Sport-SP6	5'-GCT ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3'
mCimex1	5'-TAC CAG ATC GAA GGC ACC AA-3'
mCimex2	5'-GCA GGC GGA CTC GTG AAT GA-3'
mCimex3	5'-TCT CAT TAC AAC GAC ACC TAC C-3'
mCimex4	5'-ACC CTT CTC CAC AGT TCC-3'
mCimex5	5'-CCA TAC AGG TCC TGT CCA GAG TGC-3'
mCimex6	5'-GGT TTT TAT GAG TCC TGG TGT AAC ACA GC-3'
rCimex1	5'-GGA CTC ATG AAT GAG GTA GCC-3'
rnCimex10	5'-ACA ATG ACA CCT ACC CCC TAT CAC C-3'

rnCimex11	5'-GTA CAG ATG CTC GTC CTT CAC AGC-3'
rnCimex12	5'-GGA ATA CAG CCA GAG GAG-3'
T7pcDNA3(1)	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

2.1.8 Vektoren und cDNA-Banken

pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pcDNA3.1(-)/myc-His A	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pcDNA3.1(-)/myc-His B	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pCMV Sport1	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pCMV Sport6	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pBluescript II KS(-)	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
pBluescript II SK(-)	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
SuperScript [®] Human Brain cDNA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SuperScript [®] Rat Brain cDNA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.9 Antibiotika

Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Gentamycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.10 Größenstandards

DNA:

GeneRuler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
--------------------------	--

RNA:

RNA 0,28 – 6,58 kb	Promega, Mannheim, Deutschland
--------------------	--------------------------------

Protein:

BOA-Best of All-Protein Marker	Biomol, Hamburg, Deutschland
Combithek II® Standardproteine	Roche, Mannheim, Deutschland
Rainbow Prestained 14,3 - 220kD	Amersham Pharmacia, Braunschweig, Deutsch.
Standard Blau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

2.1.11 Radioaktive Verbindungen

Na¹²⁵I in Natronlauge (pH 7 – 11, 10⁶ mCi / ml, >15 Ci / mg Iodid), Redivue α-[³²P]dCTP (3000 Ci/mmol; 10 µCi/µl), L-[³⁵S]-Methionin sowie der ¹⁴C-Rainbow Prestained Größenstandard (14,3 - 220kD) wurden von Amersham Pharmacia (Braunschweig, Deutschland) bezogen.

2.1.12 Antikörper

Die aus Kaninchen erhaltenen polyklonalen Antikörper C9 2B2 und BZ3B3 entstammten einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von S.C. Robson (Harvard Medical School, Boston, USA). Der Antikörper C9 2B2 ist gegen die NTPDase1 und BZ3B3 gegen die NTPDase2 der Ratte gerichtet. Der monoklonale Mausantikörper gegen das C-terminale Myc-Epitop wurde aus dem Klon 9E10 erhalten. Der polyklonale Kaninchenantikörper gegen den Calnexin C-Terminus wurde von StressGen (Victoria, B.C., Kanada) bezogen. Der Cy3-konjugierte anti-Kaninchen IgG Antikörper, die FITC oder Cy3-konjugierten anti-Maus IgG Antikörper, der HRP-gekoppelte anti-Kaninchen Antikörper sowie der HRP-gekoppelte anti-Maus Antikörper stammten von Dianova (Hamburg, Deutschland). Der alkalische Phosphatase-gekoppelte anti-Digoxigenin Antikörper wurde von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland) bezogen.

2.2 Puffer und Lösungen

LB-Agar, pH 7,5 :	1	% (w/v)	Casein
	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	0,5	% (w/v)	NaCl
	1,5	% (w/v)	Agar
	100	µg/ml	Ampicillin (optional)
LB-Medium, pH 7,5 :	1	% (w/v)	Casein
	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	0,5	% (w/v)	NaCl
	100	µg/ml	Ampicillin (optional)
SOB-Medium :	2	% (w/v)	Casein
	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	10	mM	NaCl
	2,5	mM	KCl
	5	mM	MgCl ₂
	5	mM	MgSO ₄
SOC-Medium :	2	% (w/v)	Casein
	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	10	mM	NaCl
	2,5	mM	KCl
	5	mM	MgCl ₂
	5	mM	MgSO ₄
	20	mM	Glucose
PBS, pH 7,4 :	137	mM	NaCl
	3	mM	KCl
	8,1	mM	Na ₂ HPO ₄
	1,9	mM	NaH ₂ PO ₄

2. Materialien und Methoden

1 x TBS, pH 7,4 :	137	mM	NaCl
	3	mM	KCl
TE-Puffer, pH 8,0 :	10	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1	mM	EDTA, pH 8,0
Ringer, pH 7,2 :	155	mM	NaCl
	5	mM	KCl
	1	mM	MgCl ₂
	2	mM	CaCl ₂
	2	mM	Na ₂ HPO ₄
	10	mM	Glucose
	0,05	% (w/v)	BSA
	10	mM	Hepes
phosphatfreier Ringer, pH 7,4 :	140	mM	NaCl
	5	mM	KCl
	1	mM	MgCl ₂
	2	mM	CaCl ₂
	10	mM	Glucose
	10	mM	Hepes
Oocyten Ringer (ORi), pH 7,4 :	90	mM	NaCl
	1	mM	KCl
	1	mM	MgCl ₂
	1	mM	CaCl ₂
	5	mM	Hepes
Ca²⁺-freier ORi, pH 7,4 :	90	mM	NaCl
	1	mM	KCl
	2	mM	MgCl ₂
	5	mM	Hepes

2. Materialien und Methoden

0,1 M NaP-Puffer, pH 8,0 :	93,2	mM	Na ₂ HPO ₄
	6,8	mM	NaH ₂ PO ₄
100 x Denhardt's :	2	% (w/v)	Ficoll 400
	2	% (w/v)	Polyvinylpyrrolidon
	2	% (w/v)	BSA
20 x SSC, pH 7,0 :	3	M	NaCl
	0,3	M	Natriumcitrat

2.3 Methoden

Standardmethoden die nachfolgend nicht näher beschrieben werden, wurden nach Sambrook J. et al. (1989) durchgeführt.

2.3.1 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Alle hitzestabilen Materialien, Medien und Lösungen wurden in feuchter Hitze bei 120 °C und 2 bar für 20 min autoklaviert. Glasgeräte und Pipetten wurden für mindestens 2 h bei 180 °C im Trockenschrank sterilisiert.

2.3.2 Bakterienkultur

2.3.2.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
<i>E. coli</i> XL10-Gold	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
<i>E. coli</i> DH5α	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>E. coli</i> TOP10	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.3.2.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

Zur Herstellung einer *E.coli*-Flüssigkultur, für analytische Plasmidisolierungen, Vor- und Dauerkulturen, wurden 5 - 8 ml LB-Amp-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und für 12 - 16 h bei 37°C auf einem Schüttler (150 - 200 rpm) inkubiert. Zum Anlegen größerer Flüssigkulturen für präparative Plasmidisolierungen wurden 200 – 300 ml LB-Amp-Medium mit 0,1 – 0,5 ml einer Flüssigkultur angeimpft und ebenfalls für 12 - 16 h bei 37°C auf einem Schüttler (150 - 200 rpm) inkubiert.

2.3.2.3 Anlegen von *E.coli*-Dauerkulturen

Zur Anlage von Dauerkulturen wurden frische *E.coli*-Flüssigkulturen mit sterilem Glycerin p.a. auf 20 % (v/v) eingestellt und bei –80°C gelagert. Die Dauerkulturen sind auf diese Weise über Jahre haltbar.

2.3.2.4 Herstellung elektrokompetenter *E.coli*

Ausgehend von einem frischen Vereinzelausstrich (*E.coli* XL10-gold, XL1-Blue oder DH5α) auf LB-Agar-Platten ohne Antibiotikum, wurden 10 ml SOB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (ca. 200 rpm) inkubiert, bis die Flüssigkultur eine optische Dichte von 0,6 bei 600 nm aufwies. Die Kultur wurde auf 0°C abgekühlt und zum pelletieren der Bakterien 15 min bei 2.600 g_{av} und 1°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet zum Waschen in eiskaltem 10 % (w/v) Glycerin resuspendiert und anschließend zentrifugiert (15 min, 2.600 g_{av}, 1°C). Der Waschvorgang wurde wiederholt, der Überstand dekantiert und das Pellet in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.2.5 Bestimmung der Transformationskompetenz

Zur Bestimmung der Transformationskompetenz wurden 1 ng zirkuläre pBluescript II SK (-)-DNA in 10 µl 10 %iger Glycerin-Lösung in einem eisgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Die Lösung wurde mit 50 µl auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen (*E.coli* XL10-Gold, XL1-Blue oder DH5α) versetzt, vorsichtig durchmischt und in eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 1 mm) überführt. Der Transformationsansatz wurde für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde in einem ElectroCell Manipulator BTX600 (S = 1,4 kV, R = 129 Ω und t = 4 msec) elektroporiert. Unmittelbar nach dem elektrischen Impuls wurde der Elektroporationsansatz mit auf 37°C vorgewärmtem SOC-Medium auf 1 ml aufgefüllt. Nach 1 h Inkubation bei 37°C auf einem Schüttler (180 – 210 rpm) wurden 200, 20 und 2 µl entnommen, mit SOC-Medium auf 200 µl aufgefüllt und auf LB-Amp-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Kompetenz erfolgte durch Auszählen der entstandenen Kolonien und Umrechnung auf 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA.

2.3.2.6 Elektroporation elektrokompetenter *E.coli*

Die Elektroporation erfolgte im wesentlichen wie unter 2.3.2.5 beschrieben. Für Retransformationen wurden im allgemeinen ca. 1 ng zirkuläre plasmid DNA einer Mini- oder Maxi-Präparation verwendet. Bei Ligationen wurden einzwanzigstel bis einfüntel des Ligationsansatzes verwendet.

2.3.3 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten, sofern nicht anders erwähnt, unter sterilen Bedingungen. Des weiteren wurden alle Medien und Lösungen, sofern nicht anders erwähnt, auf 37°C vorgewärmt, um unnötigen Stress für die Zellen zu vermeiden.

2.3.3.1 Kultivierung von CHO-Zellen

Die CHO-K1-Zelllinie (ATCC-Nr. CCL-61) wurde ursprünglich von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) bezogen. Die epithelzell-ähnliche Zelllinie ist ein Subklon einer 1958 von T.T. Puck durch Ovar-Biopsy an einem adulten Hamster (*Cricetulus griseus*) erhaltenen Zelllinie.

Die CHO-Zellen wurden in unbeschichteten Kulturschalen (Ø 150 mm) bei 37°C, 5 % (v/v) CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle 2 – 3 Tage, nach Erreichen einer Konfluenz von 50 – 60 %, wurden die adhären wachsenden Zellen passagiert. Hierzu wurden die Kulturplatten zweimal mit PBS gewaschen, 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 % (w/v) Trypsin, 0,03 % (w/v) EDTA) für 2 min appliziert und die Zellen durch leichtes Klopfen abgelöst. Nach Zugabe von 4 ml Kulturmedium wurden ca. 2×10^6 Zellen je Platte ausplattiert.

CHO-Medium :	10	% (v/v)	FCS
	1	% (v/v)	Penicillin-Streptomycin in Ham's F-12 Medium
Penicillin-Streptomycin :	5000	U/ml	Penicillin
	5000	µg/ml	Streptomycin in physiologischer Kochsalzlösung

2.3.3.2 Zellzahlbestimmung mit Trypanblau

Der nicht membranpermeable Farbstoff Trypanblau dient in einer isotonischen Kochsalzlösung zur Bestimmung der Lebendzellzahl. Da er nur tote Zellen dunkelblau anfärbt, erscheinen die lebenden Zellen in der blauen Lösung unter dem Mikroskop weiß und können somit leicht bestimmt werden.

Zur Zellzahlbestimmung wurden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau-Lösung gemischt. 50 µl dieser Mischung wurden erneut mit 50 µl Trypanblau-Lösung gemischt und in eine Neubauer-Kammer gegeben. Vier Großquadrate (je Großquadrat 10^{-4} ml Volumen) wurden ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet :

$$\text{Zellen/ml} = \text{Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} / \text{Anzahl der Großquadrate}$$

Trypanblau-Lösung :	0,4	% (w/v)	Trypanblau
	0,9	% (w/v)	NaCl

2.3.3.3 Transiente Transfektion von CHO-Zellen

CHO-Zellen dienen als Modellsystem für immuncytologische und funktionelle Untersuchungen der Ca^{2+} -NDPase. Hierzu wurden die verschiedenen Konstrukte in eukaryotische Expressionsvektoren, welche alle einen CMV-Promotor besaßen, kloniert. Mit diesen wurden CHO-Zellen transient mittels Elektroporation transfiziert.

50 % Konfluente CHO-Platten (\varnothing 150 mm) wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit je 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro Platte für 2 min inkubiert, abgeklopft und mit 4 ml CHO-Medium abgestoppt und resuspendiert. Zum Pelletieren der CHO-Zellen wurde für 5 min bei 300 g_{av} zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in je 5 ml CHO-EP-Puffer pro Platte resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde in 0,9 ml CHO-EP-Puffer pro Elektroporationsansatz (maximal zwei Platten) resuspendiert. Zirkuläre Plasmid-DNA (50 µg DNA pro Platte) wurde in sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt, 850 µl Zellsuspension zugegeben, 5 min bei RT inkubiert und anschließend in Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 4 mm) überführt. Die Elektroporation erfolgte in einem ElectroCell Manipulator ECM600 mit den folgenden Einstellungen:

$$S = 423 \text{ V} \quad C = 250 \text{ } \mu\text{F} \quad R = 129 \text{ } \Omega$$

Daraus ergab sich eine elektrische Feldstärke von 1,06 kV pro cm und eine Pulslänge von ca. 4 msec. Die Zellen durften nach dem elektrischen Impuls 5 min ruhen. Anschließend wurden die Elektroporationsansätze in jeweils 10 ml Recovery-Medium (3 mM EGTA in CHO-Medium) überführt, 30 min bei 37°C inkubiert (5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) und 5 min bei 300 g_{av} zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4 – 6 ml Medium resuspendiert und die Zellen wurden ausplattiert.

CHO-EP-Puffer :	137	mM	NaCl
	5	mM	KCl
	0,7	mM	Na ₂ HPO ₄
	6	mM	D-Glucose
	20	mM	Hepes pH 7,05

2.3.3.4 Beschichtung der Deckgläser mit poly-D-Lysin

Für immunzytologische Analysen wurden CHO-Zellen auf Deckgläser (Ø 10 mm) kultiviert. Damit die Zellen auf der Glasoberfläche adhärent anwachsen konnten, wurden die Deckgläser mit poly-D-Lysin beschichtet. Die Deckgläser wurden 30 min mit jeweils 100 µl poly-D-Lysin (10 µg / ml) überschichtet. Anschließend wurden sie dreimal mit je 100 µl H₂O_{milliQ} gewaschen und 1 h bei RT getrocknet.

2.3.3.5 Immunzytologie – intrazelluläre Markierung

24 h nach der Transfektion wurden die CHO-Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und die Zellzahl wurde bestimmt. 40.000 CHO-Zellen wurden in 1 ml Kulturmedium pro Vertiefung einer 24-Well-Platte auf poly-D-Lysin beschichteten Deckgläser ausplattiert. Nach weiteren 12 h wurden die Zellen mit einer Endkonzentration von 6 mM Natriumbutyrat für 12 h stimuliert. Die Zellen wurden zweimal mit Krebsringer gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen mit Methanol (-20°C) überschichtet und für 7 min bei -20°C inkubiert. Abschließend wurde dreimal mit PBS (0 min, 3 min und 5 min) gewaschen. Zur Absättigung

unspezifischer Bindungsstellen wurden die Methanol-fixierten Zellen mit jeweils 65 µl 5 % BSA in PBS für 30 min bei RT inkubiert. Der erste Erstantikörper (50 µl pro Deckglas) wurde für 20 min appliziert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (0 min, 3 min und 5 min) wurde der zweite Erstantikörper (50 µl pro Deckglas) ebenfalls für 20 min appliziert. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen und der erste Zweitantikörper für 20 min, im Dunkeln, aufgebracht. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der zweite Zweitantikörper ebenfalls für 20 min, im Dunkeln, appliziert. Es wurde letztmals dreimal mit PBS gewaschen. Zum Eindeckeln wurde jeweils 1 µl Anti-Fading-Lösung auf einen Objektträger aufgebracht, das Deckglas darauf montiert und mit Deckglaslack luftdicht abgeschlossen. Erst- und Zweitantikörper wurden standardmäßig in PBS mit 1 % BSA verdünnt. Die immunzytologischen Markierungen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop, ausgerüstet mit dem MCID4 Bildanalysesystem (Imaging Research, St. Catharines, Ontario, Kanada), oder mit einem konfokalen Laserscan Mikroskop (Leica, Bensheim, Deutschland) analysiert.

Antikörperverdünnungen:	5 µg/ml	anti-Myc
	1:200	anti-Calnexin
	1:200	anti-Maus-FITC
	1:400	anti-Maus-Cy3
	1:400	anti-Kanichen-Cy3
Anti-Fading-Lösung, pH 8,5 :	25	% (v/v) Glycerin
	10	% (v/v) Mowiol
	2,5	% (v/v) DABCO

2.3.3.6 Immunzytologie – extrazelluläre Markierung

Die extrazelluläre Markierung erfolgte im wesentlichen wie unter „intrazelluläre Markierung“ beschrieben. Jedoch wurden die Deckgläser vorher nicht Methanol-fixiert und unspezifische Bindungsstellen wurden nur für 20 min geblockt. Die Methanolfixierung erfolgte nach Applikation des letzten Erstantikörpers und dreimaligem Waschen mit PBS.

2.3.3.7 Markierung des Golgi-Apparates mit dem Lektin WGA

Das Lektin Wheat Germ Agglutinin (WGA) bindet selektiv an endständige N-Acetylglucosamin- und N-Acetylneuraminsäurereste glycosylierter Proteine. Es zeigt somit eine starke Markierung des medialen und trans Golgi-Apparates (Parkkinen J.J. et al. (1997)). Zur Markierung des Golgi-Apparates mit Methanol-fixierter CHO-Zellen wurde AlexaFluor® 488 konjugiertes WGA verwendet. Ausgehend von einer 1 : 700 Verdünnung der WGA-Stammlösung in PBS wurde das gleiche Protokoll wie bei einer Antikörpermarkierung verwendet.

WGA-Stammlösung :	1	mg/ml	WGA-AlexaFluor® 488- Konjugat in PBS
--------------------------	---	-------	---

2.3.3.8 Markierung des Zellkerns mit DAPI

DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der besonders an AT-reiche Bereiche der DNA bindet und somit selektiv den Nucleus der Zelle markiert. 50 µl DAPI-Lösung wurden für 20 min auf methanolfixierte und mit BSA abgesättigte CHO-Zellen gegeben und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Markierung wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

DAPI-Lösung :	1	µg/ml	DAPI in PBS
----------------------	---	-------	----------------

2.3.3.9 Herstellung grober Membranfraktionen

24 h nach der Transfektion wurden tote Zellen und Zelltrümmer durch Wechsel des Kulturmediums entfernt. Nach weiteren 10 h wurde Natriumbutyrat (Konzentration 6 mM) für 14 h appliziert. Die Platten wurden zweimal mit PBS gespült, die Zellen mit Trypsin abgelöst und abzentrifugiert (5 min, 300 g_{av}). Das Zellpellet wurde zweimal in jeweils 20 ml MF-Puffer gewaschen und anschließend in 1 – 2 ml MF-Puffer

2. Materialien und Methoden

resuspendiert. Die Proteaseinhibitorenlösungen PIA, PIB , PIC und PID wurden derart zugegeben, dass die einfache Konzentration der Stammlösungen erreicht wurde. Die Zellsuspension wurde für 1 min in einem Glas-Teflon-Potter-Elvehjam-Homogenisator homogenisiert. Zur Entfernung größerer Bruchstücke und nicht homogenisierten Zellen wurde für 10 min bei 4°C und 300 g_{av} zentrifugiert. Der Überstand wurde für 45 min bei 4°C und 100.000 g_{av} zentrifugiert. Das Ultrazentrifugationspellet wurde in 1 ml (150 mM NaCl, 10 mM Hepes pH 7,0) resuspendiert, mit dem gleichen Volumen Glycerin p.a. gemischt, aliquottiert und bei -20°C gelagert.

MF-Puffer, pH 7,4 :	140	mM	NaCl
	5	mM	KCl
	5	mM	CaCl ₂
	2	mM	MgCl ₂
	10	mM	Glucose
	10	mM	Hepes
100 x PIA :	100	mM	PMSF in EtOH
1000 x PIB :	2	mg/ml	Antipain
	2	mg/ml	Aprotinin
	2	mg/ml	Leupeptin
			in 10 mM Hepes, pH 7,4
1000 x PIC :	2	mg/ml	Chymostatin
	1	mg/ml	Pepstatin in DMSO
1000 x PID :	150	mg/ml	Benzamidin in 10 mM Hepes, pH 7,4

2.3.4 *Xenopus laevis* Oocyten

Die Oocyten des südafrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* dienen als etabliertes heterologes Expressionssystem. Sie eignen sich, aufgrund der großen Toleranz ihres Translationsapparates, zur funktionellen Expression von Proteinen aus extrahierter mRNA, in vitro synthetisierter cRNA oder kerninjizierter cDNA (Aurup H. et al., 1994).

2.3.4.1 Haltung und Pflege von *Xenopus laevis*

Adulte Weibchen wurden aus Südafrika importiert (African Xenopus Facility, Noordhoek, Südafrika) und in zur Hälfte gefüllten 280 l Wassertanks bei einer Temperatur von 16 – 18°C gehalten. Das Wasser wurde zweimal täglich für jeweils 2 h durch Zufluss von Frischwasser erneuert und die Becken wurden täglich gereinigt. Ein künstlicher 12 h Tag-Nacht-Zyklus wurde eingerichtet. Die Tiere wurden zweimal wöchentlich mit in zuckerfreiem Multisanostol® (Roland, Hamburg, Deutschland) getränkten Rinderherzstücken (toom-Markt, Rodgau, Deutschland) gefüttert.

2.3.4.2 Präparation des Ovars und der Follikelzell-freien Oocyten

Ein Weibchen wurde durch zehnminütiges Baden in Narkoselösung (MS222) betäubt und die Narkose durch Rückenlage überprüft. Durch einen 1 cm langen ventralen Einschnitt wurde ein Teil des Ovars entnommen und sofort in 19°C warmes ORI überführt. Ober- und Unterhaut wurden einzeln vernäht. Das Tier wurde nach dem Erwachen aus der Narkose über Nacht in 0,3 % (w/v) Meersalzlösung gehalten. Die frischoperierten Tiere wurden in separaten Tanks gehalten und frühestens nach einem halben Jahr auf der anderen Seite operiert. Pro Tier wurden maximal vier Operationen durchgeführt.

Die Oocytenlappen wurden bei 19°C im Inkubator aufbewahrt. Des weiteren wurden alle Lösungen mit denen intakte Oocyten in Kontakt kamen, sofern nicht anders angegeben, auf 19°C temperiert. Am Abend der Operation wurden die entnommenen Oocytenlappen zweimal mit ORi gewaschen und zur Entfernung der Follikelzellen über Nacht in Kollagenase (15 mg auf 10 ml ORi) eingelegt. Am nächsten Morgen wurden die Oocyten in ein gefettetes 50 ml Röhrchen mit Schraubverschluss überführt und 5 – 7 mal mit ORi gewaschen. Anschließend wurde für 10 min in calciumfreien ORi inkubiert und dreimal mit ORi gewaschen. Die Oocyten wurden zur Selektion in eine Petrischale (CELL+, Ø 82 mm) gegeben. Einheitliche Follikelzell-freie Oocyten der Stadien IV bis V (Colman A., 1984) wurden ausgelesen und in eine neue Petrischale überführt.

Narkoselösung, pH 7,4 :	0,2	% (w/v)	MS222
	5	mM	Hepes

2.3.4.3 Fetten von Gefäßen

Um Schädigungen der Oocyten durch Adhäsion an Gefäßwandungen zu verhindern wurden diese, wenn nötig, vor der Verwendung gefettet. Hierzu wurden sie für 10 min mit Oocytenhomogenat inkubiert. Anschließend wurden die Gefäße dreimal mit Wasser und viermal mit H₂O_{milliQ} gespült. Die so behandelten Gefäße wurden bei 30°C im Wärmeschränk getrocknet.

2.3.4.4 Heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oocyten

Die Heterologe Expression komplementärer RNA erfolgte in *Xenopus laevis* Oocyten. Unmittelbar nach dem Auslesen der Oocyten wurden 50 nl cRNA (0,5 µg/µl) pro Oocyte injiziert. Die Injektion erfolgte in den Äquator der Oocyte, so dass ein Winkel von 30° zwischen dem Lot des Äquators und dem animalischen Pol gebildet wurde. Injizierte und nicht-injizierte Kontrollloocyten wurden in ORi-Genta (50 µg/ml Gentamycin in ORi) bei 19°C aufbewahrt.

2.3.4.5 Metabolische Markierung mit L-³⁵S-Methionin

Zur radioaktiven Markierung neusynthetisierter Proteine wurden diese metabolisch durch Inkorporation von L-³⁵S-Methionin markiert. *Xenopus laevis* Oocyten wurden 1 h nach der cRNA Injektion über Nacht in 25 µl ³⁵S-Met-ORi pro 10 Oocyten bei 19°C inkubiert. Anschließend wurden die Oocyten dreimal in ORi gewaschen und in ORi-Genta kultiviert.

³⁵ S-Met-ORi :	100 MBq/ml	L- ³⁵ S-Methionin
	50 µg/ml	Gentamycin
		in ORi

2.3.4.6 Oberflächenmarkierung mit ¹²⁵Iod

Zur selektiven radioaktiven Markierung von Oberflächenproteinen wurden diese entsprechend einer nach Thompson modifizierten Methode (Thompson J.A. et al., 1987) radio-iodiert. Das Verfahren beruht auf der Reaktion von iodiertem Sulfo-SHPP, einem wasserlöslichem membranimpermeablen Bolton-Hunter-Reagenz, mit primären und sekundären Amingruppen.

10 – 12 intakte Oocyten wurden dreimal in eiskaltem Oocyten-PBS gewaschen, in etwas Oocyten-PBS (~ 10 µl) in gefettete 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gelagert. 0,5 µl Sulfo-SHPP-Lösung (0,04 µg / ml in DMSO) wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei RT vorgelegt und 2,5 µl Na¹²⁵I-Lösung (~ 3,9 MBq / µl) wurden zugegeben. Durch Zugabe von 10,5 µl Chloramin T-Lösung (5 mg / ml in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,5) wurde die Iodierung des Sulfo-SHPP's gestartet. Überschüssiges I₂ und ICl wurden durch Zugabe von 136 µl Hydroxylphenylelessigsäure-Lösung (1 mg / ml in 0,1 M NaCl) abgefangen. Überschüssiges Chloramin T wurde durch Zugabe von 10,5 µl Natriummetabisulfid-Lösung (12 mg / ml in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,5) reduziert. 15 µl der erhaltenen ¹²⁵I-Sulfo-SHPP-Lösung wurden zu den Oocyten gegeben und 1 h auf Eis inkubiert.

Anschließend wurde, zur Entfernung von nicht umgesetztem ^{125}I -Sulfo-SHPP, fünfmal mit L-Lysin-Lösung (1 mg / ml L-Lysinhydrochlorid in Ca^{2+} -freiem ORI) gewaschen.

Oocyten-PBS, pH 8,0 :	70	mM	NaCl
	30	mM	Na_2HPO_4
	1	mM	MgCl_2
	0,1	mM	CaCl_2
0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,5 :	407	mM	Na_2HPO_4
	93	mM	NaH_2PO_4

2.3.4.7 Reinigung heterolog in Oocyten exprimierter Hexahistidyl-Epitop-markierter Proteine über Ni^{2+} -NTA-Chromatographie

Heterolog in *Xenopus laevis* Oocyten exprimierte, das His₆-Epitop tragende, Membranproteine wurden mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt. Hierzu wurden die Oocyten, normalerweise 10 – 12 pro Gruppe, zweimal in Ca^{2+} -freiem ORI gewaschen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden sie in eiskaltem Homogenisierungspuffer (20 µl pro Oocyte) homogenisiert und die Membranproteine wurden für 15 min auf Eis unter gelegentlichem vortexen solubilisiert. Das Homogenat wurde zur Sedimentation des Zelldebris zweimal für 10 min bei 12.000 g_{av} und 4°C zentrifugiert. Zu 100 µl des klaren Überstandes wurden 400 µl eiskalten Bindungspuffers und 30 µl Ni^{2+} -NTA-Agarosebeads-Suspension gegeben. Die Bindung an die Beads erfolgte für 30 min unter ständiger Inversion. Anschließend wurden die Beads fünfmal mit eiskaltem Waschpuffer gewaschen und die gebundenen Proteine zweimal mit jeweils 50 µl nativen Imidazol-Elutionspuffer (NIE) für 10 min bei RT unter ständiger Bewegung eluiert.

2. Materialien und Methoden

Homogenisierungspuffer :	100	mM	Phosphat-Puffer pH 8,0
	10	mM	Iodacetamid
	0,5	mM	Pefabloc SC
	10	μ M	Leupeptin
	10	μ M	Antipain
	5	μ M	Pepstatin
	1	% (w/v)	Digitonin
Bindungspuffer :	100	mM	Phosphat-Puffer pH 8,0
	5	mM	Imidazol
	0,5	mM	Pefabloc SC
	10	μ M	Leupeptin
	10	μ M	Antipain
	5	μ M	Pepstatin
	1	% (w/v)	Digitonin
Waschpuffer :	100	mM	Phosphat-Puffer pH 8,0
	25	mM	Imidazol
	1	mM	Iodacetamid
	0,5	mM	Pefabloc SC
	0,2	% (w/v)	Digitonin
NIE, pH 7,4 :	200	mM	Imidazol mit HCl auf pH 7,4

2.3.5 Arbeiten mit DNA

2.3.5.1 Analytische Plasmidpräparation nach Birnboim und Doly

Die Präparation von Plasmiden aus *E.coli*-Transformanten für analytische Zwecke entsprach einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse der bakteriellen Zellwand (Birnboim H.C. et al., 1979).

2. Materialien und Methoden

1,5 ml einer frischen LB-Amp-Flüssigkultur wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen wurden durch 10sekündige Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 14.000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von ca. 50 - 100 µl entfernt und das Sediment darin resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 300 µl TENS-Puffer zugegeben, sofort durchmischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 150 µl 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 5,2, zugegeben und ebenfalls gut durchmischt. Zelltrümmer und chromosomale DNA wurden durch zweiminütige Zentrifugation abgetrennt und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde mit Ethanol gefällt, das Sediment in 30 µl TE/RNase A-Puffer gelöst und 15 min bei 65 °C inkubiert.

TENS-Puffer :	10	mM	Tri-HCl, pH 8,0
	1	mM	EDTA
	100	mM	NaOH
	0,5	% (w/v)	SDS
TE-RNase A-Puffer :	10	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1	mM	EDTA
	20	µg/ml	RNase A

2.3.5.2 Analytische Plasmidpräparation mit NucleoSpin®

Eine weitere Variante der analytischen Plasmidpräparation erfolgte über Anionenaustauschersäulchen (NucleoSpin®). Das Verfahren wurde im wesentlichen wie unter 2.3.5.3 beschrieben durchgeführt. Ausgehend von einer 8 ml LB-Amp-Flüssigkultur erfolgte die Präparation nach Herstellerangabe.

2.3.5.3 Präparative Plasmidpräparation

Die präparative Plasmidpräparation erfolgte über Anionenaustauschersäulen (Nucleobond AX500). Dabei wird die DNA-Präparation nach Lyse und Zentrifugation auf eine bestimmte Salzkonzentration eingestellt. Dadurch kann DNA an die Säule binden, während die deutlich weniger negativ geladene Proteine unter diesen Bedingungen nicht binden. Anschließend werden RNA und einzelsträngige DNA mit steigender Ionenstärke von der Säule gewaschen. Die Plasmid-DNA wird mit noch höherer Ionenstärke eluiert und anschließend mit Isopropanol gefällt.

Ausgehend von einer 250 – 300 ml LB-Flüssigkultur erfolgte die Präparation nach Herstellerangabe, wobei die Ausbeute im Allgemeinen 1 – 2 mg Plasmid-DNA betrug.

2.3.5.4 Phenolextraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wurden diese einmal mit dem gleichen Volumen Roti-Phenol[®] versetzt, gut durchmischt und für 5 min bei 12.000 g_{av} bis zur Phasentrennung zentrifugiert. Die phenolische Phase wurde abgezogen und verworfen. Das gelöste Phenol in der wässrigen Phase wurde anschließend zweimal mit dem einfachen Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Zwischen den Extraktionsschritten wurde jeweils für 5 min zentrifugiert. Um eine gute DNA-Rückgewinnung zu ermöglichen durfte die NaCl-Konzentration in der wässrigen Phase 0,5 M nicht übersteigen.

2.3.5.5 Ethanol- und Isopropanolfällung

Zur Konzentrierung von DNA-Lösungen und zur Entfernung von Proteinen, Salzen und nichtinkorporierten Nukleotiden wurde die DNA aus wässrigen Lösungen mit Ethanol oder Isopropanol präzipitiert.

Die Fällung der Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Einstellung der DNA-Lösung auf 0,3 M Natriumacetat (3 M Natriumacetat pH 5,2). Anschließend wurde das 2,5fache des Volumens an Ethanol p.a. zugegeben. Durch 15minütige Zentrifugation bei 12.000 g_{av} und 4°C wurde die DNA sedimentiert und der Überstand verworfen. Das so erhaltene Sediment wurde zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut für 5 min zentrifugiert, an der Luft getrocknet und in TE-Puffer oder H₂O_{bidest} aufgenommen.

Bei DNA-Konzentrationen > 0,5 µg/ml reichte eine Inkubationszeit von 2 min. Um eine gesteigerte Rückgewinnung der DNA bei stark verdünnten Lösungen (< 0,5 µg/ml) zu erhalten, wurden der Präzipitationsansatz über Nacht inkubiert, die Temperatur abgesenkt (-20°C, -80°C) und längere Zentrifugationszeiten (30 min) durchgeführt.

Die Vorgehensweise bei der Isopropanolfällung war analog der Vorgehensweise der Ethanolfällung, jedoch wurde nur das 0,6 – 0,8fache Volumen an Isopropanol p.a. zugesetzt.

2.3.5.6 Bestimmung des Reinheitsgrades und der Konzentration von nukleinsäurehaltigen Lösungen

Die Nukleinsäurekonzentration und Reinheit wässriger Lösungen wurde durch Messung der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm in einem Hitachi U2000 Spektralphotometer in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke bestimmt. Für die Konzentration gilt folgende Beziehung:

$$1 A_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g/ml dsDNA} = 40 \mu\text{g/ml RNA} = 33 \mu\text{g/ml ssDNA}$$

Die Reinheit der Nukleinsäurelösung läßt sich durch den Quotienten $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ableiten. Dieser sollte zwischen 1,8 – 2,0 liegen.

2.3.5.7 Native Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Trennung von DNA-Fragmenten und deren Größenbestimmung erfolgte in 0,7 - 2 %igen Mini- oder Midi-Agarosegelen. Die entsprechende Agarosemenge wurde in 1 x TAE- oder 1 x TBE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C mit Ethidiumbromid-Lösung auf 0,1 µg pro ml eingestellt und in die entsprechende Elektrophoreseapparatur gegossen. Nach dem Aushärten des Agarosegels wurde mit 1 x TAE- oder 1 x TBE-Puffer überschichtet. Zu den DNA-Proben wurde ein Fünftel Volumen 6 x DNA-Blue-Run gegeben. Die Proben wurden in die Taschen eingebracht, und bei einer Spannung zwischen 70 V und 110 V elektrophoretisch aufgetrennt.

50 x TAE-Puffer, pH 8,3 :	2	M	Tris-Base
	1	M	Essigsäure
	100	mM	EDTA
10 x TBE-Puffer, pH 8,3 :	1	M	Tris-Base
	830	mM	Borsäure
	10	mM	EDTA
Ethidiumbromid-Lösung :	0,1	% (w/v)	Ethidiumbromid
6 x DNA-Blue-Run :	0,09	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,09	% (w/v)	Xylencyanol FF
	60	% (w/v)	Glycerin
	60	mM	EDTA

2.3.5.8 DNA-Extraktion aus Agarose mit NucleoTrap®

Zur Separation von DNA-Fragmenten aus DNA-Fragmentmischungen wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA aus den Agarosestücken diente das

NucleoTrap® Kit, wobei den Herstellerangaben Folge geleistet wurde. Grundlage des Verfahrens ist, dass in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze die Agarose bei 50°C aufgelöst wird und die DNA unter diesen Bedingungen an die Oberfläche einer Glassuspension bindet. Nach Waschen mit einem Salz-Ethanol-Puffer und anschließender Lufttrocknung kann die DNA mit einem Niedrigsalz-Puffer eluiert werden.

2.3.5.9 DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Die Hydrolyse von DNA mittels Endonukleasen erfolgte nach Herstellerangaben mit den herstellereigenen Puffern. Das Standardreaktionsvolumen betrug 20 µl. Die Inkubation erfolgte zwischen 30 min und über Nacht bei der angegebenen Temperatur (Standard: 37°C). Die Restriktionen wurden durch native Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Bei Mehrfachhydrolysen unter anderen Pufferbedingungen wurde die DNA zwischen den Hydrolyseschritten mit Ethanol präzipitiert.

2.3.5.10 5'-Dephosphorylierung von DNA mit CIAP

Die Erhöhung der Ligationseffizienz durch Reduzierung von unerwünschten Ligationsprodukten und Religationen erforderte teilweise die Entfernung endständiger Phosphatgruppen mittels alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP). Die Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben in dessen Puffersystem für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurde das Enzym durch Einstellung auf 5 mM EDTA und zehnminütiges Erhitzen auf 70 °C deaktiviert und die DNA nach einer der beschriebenen Methoden gereinigt.

2.3.5.11 5'-Phosphorylierung von DNA mit T4 Polynukleotidkinase

Falls für die Ligation erforderlich, wurden hybridisierte Oligonukleotide (Linker) oder 5'-dephosphorylierte DNA-Fragmente mittels T4 Polynukleotidkinase 5'-phosphoryliert. Hierzu wurden 5 – 20 pmol Linker oder 5'-dephosphoryliertes DNA-Fragment in einem Reaktionsvolumen von 30 µl unter den vom Hersteller angegebenen Pufferbedingungen mit 10 U T4 Polynukleotidkinase gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 10 U T4 Polynukleotidkinase und 30minütiger Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz über das NucleoTrap Kit gereinigt.

2.3.5.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Die enzymatische Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurden mittels T4 DNA Ligase durchgeführt. In einem Reaktionsvolumen von 10 – 30 µl wurden 50 - 400 ng hydrolysierte und, falls erforderlich, 5'-dephosphorylierte Vektor-DNA eingesetzt. Die Vektor-DNA wurde mit dem dreifachen molaren Überschuß des zu inserierenden Fragments in Ligationspuffer mit 2,5 U T4 DNA-Ligase versetzt und bei RT über Nacht inkubiert. Im Falle von blunt-end-Ligationen wurde der Reaktionsansatz auf eine Endkonzentration von 5 % (w/v) PEG 4000 eingestellt. Die Ligationsansätze wurden entweder direkt in die Transformation eingesetzt oder es wurde erst mit Ethanol gefällt.

10 x Ligationspuffer, pH 7,8 :	0,4	M	Tris-HCl
	0,1	M	MgCl ₂
	0,1	M	DTT
	5	mM	ATP
	50	% (w/v)	PEG 4000 (optional)

2.3.5.13 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR (Mullis K.B., 1990; Mullis K.B. et al., 1987; Saiki R.K. et al, 1988) basiert auf dem 1983 von K.B. Mullis entwickelten Prinzip der zyklischen Primer-Hybridisierung, DNA-Polymerisation, sowie Denaturierung des entstandenen Stranges und anschließender Wiederholungen des Zykluses. Dies führt zur exponentiellen Amplifikation eines von zwei Primern begrenzten DNA-Fragmentes über mehrere Zyklen. Jeder Zyklus setzt sich aus drei Schritten (Denaturierung, Annealing, Elongation) zusammen.

Die PCR-Reaktionen wurden mit Pwo- oder Taq-DNA-Polymerasen nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zyklenzahl lagen zwischen 25 und 45 und die Annealingtemperaturen lagen zwischen 10°C unter bis 10°C über dem T_m der Primer.

2.3.5.14 Kolonie-PCR

Zum schnellen screenen von *E.coli*-Transformaten wurden maximal 1 kb lange DNA-Fragmente mittels Hot-Start-Kolonie-PCR amplifiziert. Hierzu wurden 200 µl LB-Amp.-Medium in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt, angeimpft und 2 – 3 h bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Die leicht opaque Lösung diente als Template für die PCR. Hierzu wurde eine gelbe Pipettenspitze erst kurz in der Kurzkultur und anschließend in 25 µl eiskaltem Kolonie-PCR-Mastermix geschwenkt. Der PCR-Ansatz wurde mit 15 µl PCR-Liquid-Wax überschichtet. Er wurde in den auf 94°C temperierten Metallblock gestellt und das Programm wurde gestartet.

Kolonie-PCR-Programm (T-Gradient, Biometra)

94°C	2 min		
94°C	30 sec	}	
X°C	30 sec (3 – 5°C unter T _m)	}	45 Zyklen
72°C	1 min	}	
72°C	5 min		
4°C	∞		

Kolonie-PCR-Mastermix :	2,5	μl	10 x PCR-Puffer komplett; peqlab
	0,5	μl	dNTP-Mix (je 10 mM)
	0,75	μl	Primer 1 (10 μM)
	0,75	μl	Primer 2 (10 μM)
	0,5	μl	Pwo (1 U/μl); peqlab
	20	μl	H ₂ O _{bidest}

2.3.5.15 Amplifikation radioaktiv markierter DNA-Fragmente

Die radioaktiven cDNA-Sonden (300 – 380 bp) für das Screenen von Plasmidbanken wurden mittels PCR nach folgendem Protokoll amplifiziert. Die Sonde wurde über NucleoSpin® (2 in 1) nach Herstellerangaben gereinigt. Die Abschätzung der Sondenmenge erfolgte elektrophoretisch und zur Qualitätskontrolle wurde ein Aliquot im Scintillator gemessen. Die Sonden wiesen eine spezifische Radioaktivität von 0,2 – 0,5 x 10⁹ dpm/μg auf.

PCR-Programm (T-Gradient, Biometra)

94°C	1 min		
94°C	30 sec	}	
X°C	30 sec (3 – 5°C unter T _m)	}	25 Zyklen
72°C	30 min	}	
72°C	30 min		
4°C	∞		

2. Materialien und Methoden

Mastermix :	5	μl	10 x PCR-Puffer (NH ₄)SO ₄); MBI
	2,5	μl	25 mM MgCl ₂
	1	μl	0,5 mM dNTP-Mix (je 0,5 mM)
	3	μl	10 μM Primer 1
	3	μl	10 μM Primer 2
	1	μl	Template (1 ng)
	5	μl	α-[³² P]dCTP (10 μCi/μl)
	29,25	μl	H ₂ O _{bidest}
	0,25	μl	Taq (5 U/μl); MBI

2.3.5.16 Amplifikation biotinylierter DNA-Fragmente mittels PCR

Die Herstellung biotinylierter cDNA-Sonden für das ClonCapture®-Verfahren erfolgte mittels PCR. Aufgrund des sehr langen Spacers des Biotin-21-dUTP's wurde für die PCR das „advantage PCR enzyme mix Kit“ verwendet. Die PCR erfolgte unter Verwendung des unten angegebenen Mastermix und dem angegebenen PCR-Programm. Die Sonde wurde elektrophoretisch analysiert und gereinigt.

PCR-Programm (T-Gradient, Biometra)

94°C	1 min		
94°C	30 sec	}	
48°C	30 sec	}	20 Zyklen
68°C	1 min	}	
68°C	2 min		
4°C	∞		

Mastermix :	10	µl	10 x cDNA reaction buffer; Clontech
	2	µl	50 x dNTP-Mix (je 10 mM); Clontech
	2	µl	Primer 1 (10 µM)
	2	µl	Primer 2 (10 µM)
	10	µl	Biotin-21-dUTP (0,5 mM); Clontech
	2	µl	Advantage PCR enzyme mix; Clontech
	0,5	µl	Template (~ 1 ng)
	71,5	µl	H ₂ O _{bidest}

2.3.5.17 Screenen von cDNA-Banken mittels Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde

Zum Screenen einer cDNA-Plasmidbank wurde das Colony-Lift Verfahren angewendet. Dabei wurden Kolonien von E.coli-Transformanten auf Nitrocellulosefilter übertragen und nach Denaturierung der DNA mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Hierzu wurden insgesamt zwischen 0,5 und 1 Millionen Kolonien auf LB-Amp.-Agar-Platten (Ø 140 mm) ausplattiert und auf Nitrocellulosefilter (Protran BA85, 0,45 µm, Ø 132 mm) übertragen. Die Filter wurden mit der Bakterienseite nach oben für 5 min auf drei Lagen mit Denaturierungslösung getränktem Whatman 3MM-Papier inkubiert. Anschließend wurde für 5 min auf drei Lagen in Neutralisierungslösung-getränktem Whatman 3MM-Papier inkubiert und die neutralisierten Filter wurden auf Whatman 3MM-Papier über Nacht getrocknet. Zur Fixierung der denaturierten DNA auf den Nitrocellulosefiltern wurden diese für 2 h im Vakuum auf 80°C erwärmt. Die Filter wurden für 2 h bei 65°C in Prähybridisierungslösung inkubiert und anschließend durch frische Prähybridisierungslösung ersetzt. Die radioaktiv markierte cDNA-Sonde wurde für 10 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgeschreckt, zu den Filtern gegeben (5 ng Sonde pro ml Lösung) und über Nacht bei 65°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Filter dreimal in Low-Stringency Puffer für jeweils 10 min bei 65°C gewaschen. Danach wurden sie zweimal in High-Stringency Puffer für jeweils 10 min bei 65°C gewaschen. Die leicht feuchten Filter wurden auf kunststoffbeschichtetes Papier gelegt, in Polyethylen-Folie eingeschlagen und bei

2. Materialien und Methoden

-80°C autoradiographiert. Positive Signale wurden den entsprechenden Bereichen einer Platte zugeordnet und erneut ausplattiert. Anschließend erfolgte eine erneute Screening-Runde, dies wurde solange wiederholt bis eine positive Einzelkolonie erhalten wurde.

Denaturierungslösung, pH 7,0:	0,5	M	Tris-HCl
	1,5	M	NaCl
Neutralisierungslösung :	0,5	M	NaOH
	1,5	M	NaCl
Prähybridisierungslösung :	5	x	SSC
	5	x	Denhardt's
	25	mM	NaH ₂ PO ₄
	0,1	% (w/v)	SDS
	100	µg/ml	fragmentierte Herings- sperma ssDNA
Low-Stringency Puffer :	2	x	SSC
	0,1	% (w/v)	SDS
High-Stringency Puffer :	0,2	x	SSC
	0,1	% (w/v)	SDS

2.3.5.18 ClonCapture® cDNA Selection Kit

Eine weitere Variante zum Screenen von cDNA Plasmidbanken beruht auf der Verwendung des ClonCapture® cDNA Selection Kits. Eine denaturierte biotinylierte Sonde (200 – 600 bp) bildet mit komplementären Sequenzbereichen unter Mithilfe von RecA einen stabilen Komplex (Honigberg S.M. et al., 1986; Rigas B. et al., 1986; Teintze M. et al., 1995).

Diese werden mittels magnetischer Streptavidinbeads angereichert und damit *E.coli* transformiert. Anschließend werden die Transformaten entweder klassisch durch Hybridisierung oder mittels Kolonie-PCR analysiert. Das Verfahren wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.5.19 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die enzymatische DNA-Sequenzierung durch Kettenabbruch (Sanger F.S. et al., 1977) beruht auf dem statistischen Einbau von 2',3'-Dideoxynukleotiden während der enzymatischen Synthese eines Gegenstranges entlang einer einzelsträngigen DNA-Matrize ausgehend von einem Oligonukleotid-Primer. Durch den Einbau von fluoreszenz-gekoppelten dNTP's während der Synthesereaktion lassen sich die entsprechenden Reaktionsprodukte nach elektrophoretischer Trennung sichtbar machen. Die Sequenzierungen wurden durch SRD (Oberursel, Deutschland) ausgeführt.

2.3.5.20 Konstruktion der Expressionsvektoren

**Expressionsvektor der vollständigen Ca²⁺-NDPase der Ratte:
(CERN/pCMV Sport1)**

Ausgehend von dem 1,3 kb PCR Fragment (mCimex5/mCimex6) wurden zwei sich überlappende DNA-Fragmente mittels PCR (mCimex5/mCimex2 und mCimex1/mCimex6) amplifiziert. Das mCimex5/mCimex2-Fragment wurde mit Bam HI und Xba I verdaut und das entstandene 382 bp Fragment isoliert. Das mCimex1/mCimex6-Fragment wurde mit Bam HI verdaut und das entstandene 857 bp Fragment isoliert. Beide Fragmente wurden gleichzeitig mit dem Xba I und Sma I verdauten pCMV Sport1-Vektor ligiert.

Expressionsvektor der vollständigen C-terminal Myc-His₆-Epitop-markierten Ca²⁺-NDPase der Ratte: (CERN/pcDNA3.1(-)/Myc His)

Der Expressionsvektor der vollständigen Ca²⁺-NDPase wurde mit Eco RI verdaut und das erhaltene Ca²⁺-NDPase-Fragment wurde mit dem Eco RI verdauten pcDNA3.1(-)/Myc His B-Vektor ligiert.

Expressionsvektoren der 5'-trunkierten Ca²⁺-NDPase der Ratte: (3.ATG/pCMV Sport1 und 3.ATG/pcDNA3.1(-)/Myc His)

Ausgehend vom Expressionsvektor der vollständigen Ca²⁺-NDPase wurde mittels PCR (3ATGsrpy/T7pcDNA3(1)) ein 5'-trunkiertes DNA-Fragment amplifiziert. Dieses Fragment wurde mit Eco RI verdaut und mit den Eco RI verdauten CERN/pCMV Sport1-Vektor sowie dem CERN/pcDNA3.1(-)/Myc His-Vektor ligiert.

NTPDase1 und NTPDase2 Expressionsvektoren: (pNKS2/rnNTPDase1; pNKS2/His₆rnNTPDase1; pNKS2/rnNTPDase2; pNKS2/His₆-rnNTPDase2)

Die heterologe Expression der NTPDase1 und der NTPDase2 der Ratte in *Xenopus laevis* Oocyten erfolgte durch Injektion von cRNA. Daher war es nötig, die cDNAs der beiden Enzyme in den für die cRNA-Synthese benötigten pNKS2-Vektor (Gloor S. et al., 1995) zu klonieren. Die Hexahistidyl-Epitop-markierten sowie die wildtyp-Vektoren entstammen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von G. Schmalzing (Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Deutschland). Die Sequenzen der Expressionsvektoren sind in den Anhängen A.3 bis A.6 angegeben.

2.3.7 Arbeiten mit RNA

RNasen stellen aufgrund ihrer enormen Stabilität und hohen Aktivität ein außerordentliches Problem beim Arbeiten mit RNA dar. Daher wurden alle hitzebeständigen Geräte und Materialien vor ihrer Verwendung für 3 h bei 190°C gebacken. Materialien die nicht hitzestabil waren, wurden entweder RNase-frei bezogen oder mit alkalischer Seifenlösung behandelt und mit DEPC-behandeltem Wasser nachgespült.

2.3.7.1 DEPC-Behandlung von Wasser und wäßrigen Lösungen

Zur Inaktivierung möglicher RNasen wurden Wasser und wäßrige Lösungen, sofern keine der Bestandteile primäre oder sekundäre Aminfunktionen aufwiesen, mit DEPC behandelt. DEPC carboxyethyliert primäre und sekundäre Amingruppen. Da Histidin eine wichtige Rolle im aktiven Zentrum der RNasen besitzt, werden diese durch DEPC inaktiviert.

Die wäßrigen Lösungen wurden auf 0,1 % (v/v) DEPC eingestellt. Es wurde für 2 h bei RT gerührt und das nicht umgesetzte DEPC wurde durch Autoklavierung entfernt.

2.3.7.2 Gesamt-RNA-Isolation mit TRIzol®

Die RNA-Isolierung mit TRIzol® (Chomczynski P. et al., 1987) beruht zum einen auf der denaturierenden Wirkung des chaotropen Guanidiniumthiocyanats auf Proteine, wodurch auch RNasen sehr schnell denaturiert werden. Zum anderen beruht sie auf der Löslichkeit von DNA und Proteinen in leicht sauren Phenol, wohingegen RNA in leicht sauren Phenol nahezu unlöslich ist. Somit reichern sich in der phenolischen Phase Proteine und DNA an, während die RNA in der wäßrigen Phase verbleibt.

Das Versuchstier (*Rattus norvegicus*, Wistar, Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland) wurde mittels CO₂-Begasung betäubt und dekapitiert. Die gewünschten Organe wurden zügig präpariert und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. 1 – 2 g Gewebe wurden in 10 ml TRIzol mit dem Ultraturrax-Homogenisator homogenisiert und für 5 min bei RT inkubiert. 2 ml Chloroform wurden unter sanfter Bewegung zugegeben, 15 sec kräftig durchmischt und das Homogenat wurde für 15 min bei 4°C und 12.000 g_{av} zentrifugiert. Die Oberphase wurde abgenommen, die Gesamt-RNA durch Isopropanol Zugabe gefällt und es wurde für 10 min bei 12.000 g_{av} und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 – 10 ml 75% Ethanol gewaschen, für 10 min bei 4°C und 7.500 g_{av} zentrifugiert, luftgetrocknet und in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen.

2.3.7.3 mRNA-Isolierung über Oligo(dT)-Zellulose

Je 100 µg Gesamt-RNA wurden 1 mg Oligo(dT)-Cellulose eingesetzt. Dieser wurden zur Hydratisierung 20 µl 1 x Bindungspuffer (0,5 M NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5) pro mg Zellulose zugegeben und es wurde für 1 h unter ständigem Schütteln bei RT inkubiert. Zur Gesamt-RNA wurde das einfache Volumen an 2 x Bindungspuffer gegeben, für 5 min bei 65°C denaturiert und auf Eis abgeschreckt. Die Bindung des poly(A)-Schwanzes der mRNA an die Oligo(dT)-Zellulose erfolgte unter ständiger Bewegung für 15 min bei RT. Nach Zentrifugation (4 min, 3.000 g_{av}, 15°C) wurde der Überstand abgenommen und die Zellulose wurde sechsmal in jeweils 200 µl Bindungspuffer gewaschen. Zur Elution wurden 400 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,5 zugegeben. Es wurde für 5 min inkubiert, zentrifugiert (4 min, 3.000 g_{av}, 15°C) und das Eluat abgenommen. Die mRNA wurde mit Isopropanol bei -20°C über Nacht gefällt, in 1 ml 75 % Ethanol, in DEPC-behandeltem Wasser gewaschen, luftgetrocknet, in DEPC-behandeltem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

2.3.7.4 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Gelapparatur, Gelbrücke und Kämme wurden zur RNase-Denaturierung mit alkalischer Seifen-Lösung vorbehandelt und anschließend gründlich mit DEPC-behandeltem Wasser abgespült. 0,3 g Agarose wurden in 22,5 ml DEPC-behandeltem Wasser geschmolzen, auf 50°C abgekühlt, 3 ml 10 x RNA-Gel-Puffer und 4,5 ml 37% Formaldehyd-Lösung zugegeben und gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde mit Laufpuffer (1 x RNA-Gel-Puffer, 3,7% Formaldehyd) überschichtet. Probenzusammensetzung :

4,4	µl	RNA-Lösung
1,3	µl	10 x RNA-Gel-Puffer
0,9	µl	37% Formaldehyd
6,7	µl	deionisiertes Formamid

Die Proben wurden 20 min bei 70°C und 10 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 1,5 µl 10 x RNA-Blaumarker zugegeben. Vor dem Probenauftrag lag für 5 min eine Spannung von 50 V an. Anschließend wurden die Probentaschen mit Laufpuffer gespült, die Proben aufgetragen und für 2,5 h bei einer Spannung von 80 V elektrophoretisch aufgetrennt.

10 x RNA-Gel-Puffer, pH 7,0 :	50	mM	Natriumacetat
	10	mM	EDTA
	200	mM	MOPS

10 x RNA-Blaumarker :	0,25	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,25	% (w/v)	Xylencyanol FF
	0,25	% (w/v)	SDS

2.3.7.5 Northern Blot

Zur Überführung der RNA auf eine Nylon-Membran wurde ein Druckblot durchgeführt. Das RNA-Gel wurde zweimal für jeweils 10 min in DEPC-behandeltem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel für 10 min in 10 x SSC-Lösung equilibriert. Der Druck-Blot erfolgte für 1,25 h bei einem Druck von 80 mmHg auf eine Hybond Nylon-Membran. Nach Lufttrocknung der Membran wurde die RNA auf dem Blot UV-fixiert ($0,12 \text{ J} / \text{cm}^2$). Die Digoxigenin-markierte Antisense-RNA-Sonde wurde für 10 min bei 68°C in Prähybridisierungslösung denaturiert. Anschließend wurde der Blot mit 100 ng Antisense-RNA-Sonde pro ml Lösung über Nacht bei 68°C inkubiert. Der Blot wurde zweimal für je 5 min bei RT gewaschen (2 x SSC, 0,1 % SDS). Anschließend wurde zweimal für jeweils 10 min bei 68°C gewaschen (0,1 x SSC, 0,1 % SDS). Der Blot wurde 2 min bei RT in Puffer 1 gewaschen. Anschließend wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungen für 30 min mit Puffer2 inkubiert. Zur Markierung der Digoxigenin-markierten RNA wurde für 30 min mit dem mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-Digoxigenin Antikörper inkubiert (1:2500 Verdünnung in Puffer 2). Zur Detektion mittels Chemilumineszenz wurde CSPD (Roche, Mannheim, Deutschland) in Puffer3 verdünnt (1:100) und für 5 min mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde der Blot in PE-Folie eingeschlagen und für 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Detektion der Chemilumineszenz dienten unterschiedlich lange Expositionszeiten eines Röntgenfilms.

Prähybridisierungslösung :	5	x	SSC
	50	% (v/v)	deionisiertes Formamid
	0,02	% (w/v)	SDS
	0,1	% (w/v)	N-Lauroylsacosin
	2	% (w/v)	Blocking-Reagenz
Puffer 1, pH 7,5:	0,1	M	Maleinsäure
	0,15	M	NaCl
	0,3	% (v/v)	Tween-20
			pH mit NaOH eingestellt

Puffer 2:	1	% (w/v)	Blockingreagenz
Puffer 3, pH 9,5:	0,1	M	Tris/HCl
	0,1	M	NaCl
	50	mM	MgCl ₂

2.3.7.6 Methylenblau -Färbung geblotteter RNA

Um RNA, insbesondere den RNA-Größenstandard, anzufärben wurde der UV-fixierte Nylon-Blot für 15 min in 5 % Essigsäure inkubiert. Anschließend wurde für 5 – 10 min in Methylenblau-Färbelösung (0,5 M Natriumacetat pH 5,2 und 0,04 % Methylenblau) unter ständiger Bewegung inkubiert. Der Blot wurde in Wasser gewaschen bis das Signal/Hintergrund-Verhältnis zufriedenstellend war.

2.3.7.7 cRNA-Synthese

Die heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oocyten beruhte auf der Injektion der entsprechenden cRNAs. Zur Synthese der benötigten cRNAs wurden die NTPDase1- und NTPDase2-Expressionsvektoren am Ende des PolyA-Schwanzes mit Not I linearisiert. Die linearisierte DNA wurde mit Ethanol gefällt und in 0,5 x TE-Puffer aufgenommen. Ausgehend von diesen Templates erfolgte die Synthese der run-off Cap-cRNA mit dem SP6-RNA-Polymerase-Kit (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers. Die cRNA wurde mittels Sepharose G50-Chromatographie und Phenol-Extraktion gereinigt. Die so erhaltene cRNA wurden in 5 mM Tris/HCl pH 7,2 auf eine Endkonzentration von 0,5 µg/µl eingestellt und bei -80°C gelagert.

Zur Synthese der Digoxigenin-markierten Antisense-cRNA-Sonde diente der mit Acc 65I linearisierte Vektor CERN/pCMV Sport1. Die Synthese erfolgte mit dem T7-RNA-Polymerase-Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers.

2.3.8 Proteinchemische Methoden

2.3.8.1 Proteinbestimmung nach Spector

Die Proteinbestimmung nach Spector (Spector T., 1978) stellt eine Modifikation des ursprünglichen Bradford-Tests dar (Bradford M.M., 1976). Die Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Somit stellt die Zunahme der Absorption bei 595 nm ein Maß für die Proteinkonzentration dar.

Die zu bestimmende Probe wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 100 μl aufgefüllt. Es wurde 1 ml Spector-Lösung zugegeben, 20 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 595 nm wurde gegen eine Nullprobe gemessen. Zur Konzentrationsbestimmung wurden die Absorptionswerte mit einer BSA-Eichgeraden (0 – 60 $\mu\text{g/ml}$) verglichen.

Spector-Lösung :	5	% (v/v)	Ethanol
	10	% (v/v)	85% Phosphorsäure
	100	mg/l	Coomassie G-250

2.3.8.2 Proteinbestimmung nach Peterson

Die Proteinbestimmung nach Peterson (Peterson G.L., 1983, 1979, 1977) ist eine Abwandlung des Lowry-Tests (Lowry O.H. et al., 1951). Dabei bilden Cu^{2+} -Ionen unter alkalischen Bedingungen mit Proteinen einen Komplex, wodurch diese zu Cu^{+} -Ionen reduziert werden (Biuret-Reaktion). Die Cu^{+} -Ionen bilden nun Ihrerseits mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz einen instabilen blauen Komplex, dessen Absorption bei 750 nm ein Maß für die Proteinkonzentration ist. Der Peterson-Test ist im Vergleich zum Spector-Test wesentlich empfindlicher bezüglich vieler Pufferbestandteile und Detergentien. Daher wurden die Proben vorher gefällt.

2. Materialien und Methoden

Die Probe wurde auf 1 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgefüllt, mit 10 μl 0,15% DOC-Lösung versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Zum Pelletieren des Proteins wurde 1 h bei 4°C und 15.000 g_{av} zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 μl 0,1 N NaOH gelöst. Zu 200 μl dieser Proteinlösung wurden 200 μl Lösung A gegeben, gut durchmischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden unter leichter Bewegung 100 μl Lösung B zugegeben, für 30 min bei RT inkubiert und die Absorption wurde bei 750 nm gegen eine Nullprobe gemessen. Zur Konzentrationsbestimmung wurden die Absorptionswerte mit einer BSA-Eichgeraden (0 – 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) verglichen.

CTC-Lösung :	0,1	% (w/v)	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
	0,2	% (w/v)	K-Na-Tartrat $\times 4 \text{ H}_2\text{O}$
	10	% (w/v)	Na_2CO_3
Lösung A :	0,2	N	NaOH
	2,5	% (w/v)	SDS
	25	% (v/v)	CTC-Lösung
Lösung B :	16,7	% (v/v)	Folin Ciocalteau-Reagenz

2.3.8.3 Diskontinuierliche denaturierende SDS-PAGE

Die diskontinuierliche denaturierende SDS-PAGE wurde im wesentlichen wie in Sambrook J. et al. (1989) beschrieben durchgeführt. Über einem linearen 4 – 10 %igem oder uniformen (10 oder 15 %) Trenngel wurde ein 4 %iges Sammelgel gegossen. Die Proben wurden unmittelbar vor dem Auftragen mit 5 x LiDS-SB auf einfache Konzentration eingestellt. Wenn notwendig, wurden die Proben vor der Elektrophorese in Gegenwart von 100 mM DTT für eine halbe Stunde bei 37°C reduziert. Nach dem Auftragen wurden die Proben bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt.

40% Acrylamid (29:1) :	38,7	% (w/v)	Acrylamid
	1,3	% (w/v)	Bisacrylamid

2. Materialien und Methoden

4 x Trenngelpuffer, pH 8,8 :	1,5	M	Tris-HCl
	0,4	% (w/v)	Lithiumdodecylsulfat
4 x Sammelgelpuffer, pH 6,8 :	0,5	M	Tris-HCl
	0,4	% (w/v)	Lithiumdodecylsulfat
Laufpuffer :	100	mM	Tris-Base
	100	mM	Glycin
	0,1	% (w/v)	SDS
5 x LiDS-SB, pH 6,8 :	300	mM	Tris-HCl
	10	% (w/v)	Lithiumdodecylsulfat
	0,5	% (w/v)	Bromphenolblau
	50	% (w/v)	Glycerin

2.3.8.4 Blau Native Gelelektrophorese

Zur Analyse nativer multimerer Komplexe nach heterologer Expression in *Xenopus laevis* Oocyten, nach radioaktiver Markierung und Aufreinigung über Ni²⁺-NTA-Agarose, diente die von Schägger (Schägger H., 2001, 1996, 1995, 1994b, 1994a, 1991) entwickelte Blau Native-Gelelektrophorese (BN-PAGE). Das Verfahren beruht auf einer Ladungsverschiebung der Proteine durch Anlagerung des negativ geladenen Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an positiv geladene, sowie hydrophobe Bereiche. Durch die Anlagerung an hydrophoben Bereichen dient der Farbstoff als Detergensersatz während der Elektrophorese von Membranproteinen. Die BN-PAGE wurde wie von Schägger beschrieben durchgeführt. Über einem linearen 4 – 16 %igem Trenngel wurde ein 4 %iges Sammelgel gegossen. Zur Kontrolle des Laufverhaltens und als Referenz wurde an jedem Ende des Gels eine Spur mit 10 µl 1 x BN-Standard beladen (Anhang A.7). Die Proben wurden unmittelbar vor dem Auftragen mit 5 x BN-SB auf einfache Konzentration eingestellt, aufgetragen und bei 80 – 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Visualisierung der radioaktiv markierten Proteine wurden die getrockneten Gele autoradiographiert.

2. Materialien und Methoden

Kathodenpuffer, pH 7,0 :	50	mM	Tricin
	15	mM	Bistris
	0,005	% (w/v)	Coomassie G-250
Anodenpuffer, pH 7,0 :	50	mM	Bistris
3 x Gelpuffer, pH 7,0 :	1,5	M	6-Aminocaprinsäure
	150	mM	Bistris
30% Acrylamid (37,5:1) :	29,22	% (w/v)	Acrylamid
	0,78	% (w/v)	Bisacrylamid
5 x BN-SB, pH 7,0 :	1	% (w/v)	Coomassie G-250
	100	mM	6-Aminocaprinsäure
	50	% (v/v)	Glycerin
1 x BN-Standard :	0,2	% (w/v)	Coomassie G-250
	20	mM	6-Aminocaprinsäure
	10	% (v/v)	Glycerin
	10	% (w/v)	Ferritin
	10	% (w/v)	Katalase
	10	% (w/v)	Aldolase
	10	% (w/v)	Ovalbumin
	5	% (w/v)	BSA

2.3.8.5 Proteinfärbung im PA-Gel mit Coomassie Brilliant Blue R-250

Zur Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250 wurde das PA-Gel für 1 – 2 h in Färbelösung geschwenkt und anschließend in Entfärbelösung solange geschwenkt bis das Signal/Hintergrund-Verhältnis zufrieden stellend war. Das gefärbte PA-Gel wurde nach der Färbung im Gelrockner unter Vakuum bei 80°C für mindestens 2 h getrocknet.

2. Materialien und Methoden

Färbelösung :	0,1	% (w/v)	Coomassie brilliant blue R-250
	45	% (v/v)	Methanol
	10	% (v/v)	Essigsäure
Entfärbelösung :	10	% (v/v)	Methanol
	10	% (v/v)	Essigsäure

2.3.8.6 Western-Blot

Das folgende Western Blot-Protokoll ist eine Modifikation des Verfahrens von Kyhse und Andersen (Kyhse et al, 1984).

Drei Lagen in Kathodenpuffer getränkten Filterpapiers (Whatman 3MM) wurden auf die Kathode einer Semi-Dry-Blot-Apparatur gelegt. Das PA-Gel wurde in Kathodenpuffer equilibriert und auf den Filterstapel gelegt. Die Blotmembran (Nitrocellulose [PROTRAN BA85] oder PVDF [Immobilon P]) wurde in Anodenpuffer I equilibriert und auf das Gel gelegt. Darüber wurden drei Lagen in Anodenpuffer I getränkten und drei Lagen in Anodenpuffer II getränkten Filterpapiers gelegt. Auf den Luftblasen-freien Stapel wurde die Anode der Apparatur montiert. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² des PA-Gels für 0,75 – 1,5 h.

Kathodenpuffer, pH 9,4 :	25	mM	Tris-Base
	40	mM	6-Aminocaprinsäure
	10	% (v/v)	Methanol
Anodenpuffer I, pH 10,4 :	30	mM	Tris-Base
	10	% (v/v)	Methanol
Anodenpuffer II, pH 10,4 :	300	mM	Tris-Base
	10	% (v/v)	Methanol

2.3.8.7 Slot-Blot

Sollten mehrere Proben ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung immunologisch analysiert werden wurde ein modifiziertes Dot-Blot-Verfahren angewendet. Hierzu wurden die Proben in die Schlitze der Minifold II, einer Slot-Blot-Apparatur mit 72 Schlitzen à 6 mm², gegeben und durch Unterdruck durch eine Nitrocellulosemembran gesaugt.

2.3.8.8 Proteinfärbung auf Nitrocellulosemembranen mit Ponceau S

Zum Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen wurden diese mit Ponceaurot gefärbt. Die Färbung besitzt eine Empfindlichkeit von ca. 50 – 150 ng Protein pro 0,5 cm Bande, ist schnell und reversibel. Somit kann eine Immundetektion noch nach der Färbung durchgeführt werden.

Der Nitrocellulose-Blot wurde für 1 – 2 min bei RT in Ponceau S-Lösung gefärbt. Anschließend wurde der überfärbte Blot so lange in Wasser gewaschen bis der Hintergrund entfärbt war.

Ponceau S-Lösung :	0,2 % (w/v)	Ponceau S
	3 % (V/V)	TCA

2.3.8.9 Immundetektion immobilisierter Antigene

Auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membran geblottete Antigene wurden mittels Antikörpern immunologisch nachgewiesen. Hierzu wurde zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungstellen auf der Blotmembran für 30 min mit TBS-M (Alternativ in TBS-B) inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal kurz mit TBS gespült und für 1 h bei RT mit dem 1. Antikörper inkubiert. Nach Entfernung der Antikörperlösung wurde einmal für 10 min mit TBS-M, zweimal für je 10 min mit TBS-MN und zweimal für je 10 min wieder mit TBS-M gewaschen.

2. Materialien und Methoden

Der HRP-konjugierte Zweitantikörper wurde für 2 h bei RT appliziert. Danach wurde einmal für 10 min mit TBS, zweimal für je 10 min mit TBST und abschließend zweimal für je 5 min mit TBS gewaschen. Nach Entfernung des TBS wurden pro Inkubationsschale 4 ml ECL-Lösung 2 und 2 ml ECL-Lösung 1 zugegeben und für 1 min unter ständiger Bewegung bei RT inkubiert. Die Blotmembran wurde knitterfrei in Polyethylenfolie eingeschlagen und in eine Autoradiographiekassette gelegt. Hyperfilm ECL-Filme wurden für unterschiedliche Expositionszeiten der Chemieluminiszenz ausgesetzt und nach Herstellerangabe entwickelt.

TBS-M :	3 % (w/v)	Magermilchpulver in TBS
----------------	-----------	----------------------------

TBS-B :	3 % (w/v)	BSA in TBS
----------------	-----------	---------------

TBS-MN :	3 % (w/v)	Magermilchpulver
	0,05 % (w/v)	Nonidet NP40 in TBS

TBST :	0,1 % (w/v)	Tween-20 in TBS
---------------	-------------	--------------------

1.Antikörper-Lösung :		1.Antikörper
	1 % (w/v)	BSA
	0,02 % (w/v)	Natriumazid in TBS

2.Antikörper-Lösung :		2.Antikörper
	1 % (w/v)	BSA in TBS

2.3.8.10 Deglycosylierungsanalysen

Zur Untersuchung des Glycosylierungsstatus wurden Aliquots (10 µl) solubilisierten und über Ni^{2+} -NTA-Agarose gereinigten Proteins unmittelbar vor der Elektrophorese mit Endo H oder PNGase F inkubiert.

Die Deglycosylierung mit Endo H erfolgte nach Zugabe von 50 U Endo H in einfach LiDS-SB und 20 mM DTT für 2 h bei 37°C. Deglycosylierungen mit PNGase F erfolgten nach Einstellung auf 1 % (w/v) Octylglucosid durch Zugabe von 50 U PNGase F ebenfalls für 2 h bei 37°C.

2.3.8.11 Glutardialdehyd-Cross-Linking

Zur Untersuchung des Oligomerisierungsstatus der heterolog in *Xenopus laevis* Oocyten exprimierten NTPDase1 und NTPDase2 wurden Aliquots (10 µl) solubilisierten und über Ni^{2+} -NTA-Agarose gereinigten Proteins mit Glutardialdehyd (10 mM) auf Eis über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE analysiert.

2.3.9 Aktivitätsmessungen

2.3.9.1 Bestimmung von Orthophosphat nach Lanzetta

Als Maß für die Enzymaktivität diente die Menge an freigesetztem Orthophosphat (P_i). Diese wurde mit einer nach Lanzetta (Lanzetta P.A. et al., 1979) modifizierten photometrischen Methode bestimmt. Die Empfindlichkeit dieses Nachweises lag im Nanomol-Bereich. Das Verfahren beruht auf der Bildung eines Komplexes aus Ammoniumheptamolybdat, Phosphat und Malachitgrün unter sauren Bedingungen und der Stabilisierung dieses Komplexes durch Natriumcitrat.

2. Materialien und Methoden

Zur Herstellung der Lanzetta-Lösung wurden drei Teile Lösung 1 mit einem Teil Lösung 2 zusammengegeben und für 2 h gerührt. Anschließend wurden pro 100 ml dieser Lösung jeweils 2 ml einer 1% Triton X-100-Lösung zugegeben. Die fertige Lösung wurde zweimal durch Rundfilter (Typ 604, Ø 150 mm, Schleicher&Schuell) filtriert. Ein Aliquot der Probe wurde mit H₂O_{milliQ} auf 100 µl aufgefüllt, 800 µl Lanzetta-Lösung wurden zugegeben und nach 1 min mit 100 µl Citrat-Lösung gestoppt. Nach weiteren 30 min wurde die Absorption bei 645 nm gegen eine Nullprobe gemessen. Zur Konzentrationsbestimmung wurden die erhaltenen Absorptionswerte mit einer Dikaliumhydrogenphosphat Eichreihe (0 – 10 nmol / 100 µl) verglichen.

Lösung 1 :	0,045 % (w/v)	Malachitgrün in H ₂ O _{bidest}
Lösung 2 :	4,2 % (w/v)	Ammoniummolybdat in 4 N HCl
Citrat-Lösung :	34 % (w/v)	Trinatriumcitrat in H ₂ O _{bidest}

2.3.9.2 Aktivitätsmessungen an intakten Oocyten

Die Oberflächenaktivität der NTPDase1 und NTPDase2 wurde nach heterologer Expression an intakten *Xenopus laevis*-Oocyten im linearen Bereich des Substratumsatzes gemessen. Als Kontrolle dienten nicht injizierte Oocyten. Hierzu wurden Oocyten für 0, 3 und 6 min bei RT unter ständiger Bewegung in substrathaltigem ORi (2 mM ATP oder ADP) inkubiert. Der Inkubationsüberstand wurde abgenommen und die Menge an gebildetem freien Phosphat nach Lanzetta wurde bestimmt.

2.3.9.3 Aktivitätsmessungen mit CHO-Membranfraktionen

Zur Aktivitätsbestimmung der Ca^{2+} -NDPase wurden Membranfraktionen transient transfizierter CHO-Zellen verwendet. Als Kontrolle dienten Membranfraktionen Mock-transfizierter CHO-Zellen. Die Menge an eingesetzter Membranfraktion pro Aktivitätstest wurde so gewählt, dass nach 15 minütiger Inkubation bei 37°C weniger als 10 % Substrat verbraucht waren. Im Falle der Bestimmung des K_m -Wertes wurde die Menge so gewählt, dass bei allen Substratkonzentrationen im linearen Bereich des Substratumsatzes gemessen wurde. Die Proben wurden nach der Inkubation bei 37°C sofort für 4 min bei 95°C hitzeinaktiviert und auf Eis abgeschreckt bevor die gebildete Orthophosphatmenge mittels Lanzetta bestimmt wurde. Die Aktivitäten der Kontrollen wurden subtrahiert.

Die Substratspezifität wurde in phosphatfreier Lösung, welche 0,02 % Triton, 50 mM Hepes (pH 7,0), 1 mM CaCl_2 und 0,5 mM Substrat enthielt, bestimmt. Das pH-Optimum der katalytischen Aktivität wurde in einem kombinierten Hepes-Glycin-Puffer (je 50 mM), welcher 1 mM CaCl_2 und 0,5 mM UDP enthielt, zwischen pH 6,0 und 10,5 bestimmt. Die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von divalenten Kationen wurde in 50 mM Hepes (pH 7,0), 0,5 mM UDP sowie bis zu 4 mM Calcium oder Magnesiumionen gemessen. Zur Bestimmung des K_m -Wertes für UDP wurde in 50 mM Hepes (pH 7,0) und steigender Substratkonzentration, wobei ein Substrat:Calcium-Verhältnis von 1:2 eingehalten wurde, gemessen.

2.3.9.4 Triton X-114 Präkonditionierung

Vor der Verwendung von Triton X-114 wurden eventuell vorhandene Oxidationsprodukte durch Präkonditionierung in TBS entfernt. Hierzu wurden 1,5 g Triton X-114 auf Eis in 50 ml TBS gelöst. Anschließend wurde auf 37°C erwärmt, durch die Überschreitung des Wolkenpunktes von 22°C bilden sich zwei Phasen. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 10.000 g_{av} und RT wurde die wässrige Phase dekantiert und das Ganze dreimal wiederholt. Die resultierende Detergensangereicherte Phase enthält 12 % (w/v) Triton X-114.

2.3.9.5 Triton X-114 Separation

Die Mizellengröße von Triton X-114 nimmt mit steigender Temperatur exponentiell zu, bis am Wolkenpunkt (22°C) eine Phasentrennung stattfindet. Diesen Umstand nutzt das Verfahren von Bordier (Bordier C., 1981) aus. Dabei werden Membranproteine in eiskalter Lösung mit Triton X-114 solubilisiert. Anschließend wird die Lösung über den Wolkenpunkt erwärmt und die beiden Phasen wurden voneinander getrennt. In der Detergens-armen Phase befinden sich die löslichen Proteine, wohingegen integrale Membranproteine in der Detergens-reichen Phase angereichert werden.

Membranfraktionen aus $0,4 \times 10^6$ CHO-Zellen transfiziert mit Ca^{2+} -NDPase (wt oder 5'-trunkiert) cDNA oder leerem Plasmid als Kontrolle wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 300 μl aufgefüllt. Die Lösungen wurden auf 1 % (w/v) Triton X-114 eingestellt und für 10 min auf Eis solubilisiert. Nach der Solubilisierung wurden 50 μl Aliquots für die Aktivitätsmessung (Total-Aktivität) entnommen. Die verbliebenen Lösungen wurden für 10 min auf 30°C erwärmt und für 5 min bei 12.000 g_{av} und 25°C zentrifugiert. Die wäßrige Detergens-arme Phase wurde abgezogen und die verbliebene Detergens-reiche Phase in in eiskaltem Hepes-Puffer (50 mM, pH 7,0) resuspendiert. Alle Lösungen wurden hinsichtlich ihrer UDPase-Aktivität (50 mM Hepes pH 7,0; 0,5 mM UDP; 1 mM CaCl_2 ; 0,1 (w/v) Triton X-100) bei 37°C untersucht.

2.3.9.6 Proteinase K/Triton X-100-Assay

Membranfraktionen aus 7750 CHO-Zellen transfiziert mit Ca^{2+} -NDPase cDNA oder leerem Plasmid als Kontrolle wurden in 0,5 mM CaCl_2 , 25 mM Hepes (pH 7,4) zusammen mit einem, zwei oder keinem der folgenden Zusätze für 30 min bei 37°C inkubiert: Proteinase K (2,5 μg) und Triton X-100 (0,02 %). Anschließend wurde die Proteinase K-Aktivität durch Zugabe von 1 mM PMSF gestoppt. Die Enzymaktivität wurde nun in 25 mM Hepes (pH 7,4), 0,5 mM UDP und 1 mM CaCl_2 , sowie wenn angezeigt, mit 0,02 % Triton X-100, gemessen. Die gebildete Menge an Orthophosphat wurde mittels der Lanzetta-Methode bestimmt.

2.3.10 Computerunterstützte Analysen

Das Omiga 2.0 Sequenzanalyse-Programm (Oxford Molecular Ltd., Oxford, UK) wurde zur Analyse und Assemblierung von Sequenzdaten, zur Übersetzung von DNA-Sequenzen in Protein-Sequenzen sowie zur Generierung von Hydrophatie-Plots (Kyte J. et al., 1982) verwendet. Zur Erstellung multipler Sequenzalignments und phylogenetischer Stammbäume wurde das freie Tool ClustalX 1.81 (Jeanmougin F. et al., 1998) verwendet. Zur Visualisierung ClustalX generierter phylogenetischer Stammbäume wurde das freie Tool TreeView 1.6.1 (Page R.D.M., 1996) verwendet. Desweiteren wurden eine Reihe von Internetdiensten für diverse Analysen verwendet.

Zur Visualisierung von Multiple-Alignment files:

BOXSHADE http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html

Proteinsequenzvergleich mit der Prosite-Datenbank:

http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html

Signalpeptid-Vorhersage:

SignalP 2.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>

PSORT II <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>

Transmembrantopologie-Vorhersage:

HMMTOP <http://www.enzim.hu/hmmtop/>

DAS <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>

TMpred http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html

Toppred2 <http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2/>

TMHMM-2.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

Sequenzhomologie-Suche:

NCBI BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

3. Ergebnisse

3.1 Partielle Klonierung der humanen Ca^{2+} -NDPase

Die Proteinsäuresequenz der löslichen sekretierten Apyrase der Bettwanze *Cimex lectularius* (GenBank® Accession-Nr. AAD09177; Valenzuela J.G. et al., 1998) diente als Suchvorlage für Sequenzhomologien. In der humanen Expressed Sequence Tag (EST)-Datenbank des *National Centre for Biotechnology Information (NCBI)* konnten fünf sich überlappende homologe Sequenzfragmente identifiziert werden (AA337541, AW402618, AW409804, BE301945 und BE410063). Diese wurden mit Hilfe des Programms ClustalX (Version 1.81, Thompson J.D. et al., 1994) aneinander ausgerichtet und manuell auf mögliche Sequenzierfehler überprüft. Auf diese Weise konnte eine 900 bp lange Konsensussequenz gebildet werden. Innerhalb dieser Sequenz wurden zwei PCR-Primer abgeleitet (Cimex1: 5'-TACCAGATC-GAAGGCAGCAA-3' und Cimex2: 5'-GCAGGCAGACTCATGGATGA-3'). Ausgehend von einer Humanen-Gehirn-cDNA-Bank konnte unter Verwendung dieser Primer das erwartete 300 bp Fragment amplifiziert werden.

Dieses Fragment diente nach radioaktiver Markierung als Sonde zur Durchmusterung von ca. einer Million E.coli-Transformaten. Es konnte ein positiver Klon (Klon CH3) identifiziert werden. Dieser Klon trug ein 2,7 kb großes Insert, welches sich aus 786 bp codierender Sequenz und ca. 1,9 kb 3'-untranslatiertem Bereich zusammensetzte. 5'-untranslatierter Bereich als auch der vordere Teil der Sequenz, inklusive Startcodon, fehlten. Ausgehend von der Information des Klons CH3 konnte die Sequenz in den Daten des Human Genome Projects auf Chromosom 17 in Band q25 lokalisiert werden (**Abb. 3.1.1**). Anhand dieser Daten (Accession-Nr. NT010664) konnte der codierende Bereich *in silico* vervollständigt werden (**Abb. 3.1.2**). Der theoretische offene Leserahmen betrug 1203 bp und codierte für 401 Aminosäurereste. Die cDNA bestand aus fünf Exons, wobei die codierende Information aus den drei letzten Exons gebildet wurde. Innerhalb des Leserasters fanden sich drei mögliche Startcodons, von denen keines eine Kozak-Konsensussequenz (Kozak M., 1999 und 1996) aufwies.

PCR-Primer wurden stromaufwärts des offenen Leserahmens (Cimex5: 5'-AAT GGA ATG AGT CTA TGC ACT C-3'; Cimex6: 5'-GAA CTA AGA TGT GAC TGG-3'; Cimex7: 5'-TGC TGT GGA AAG ACT TCA CG-3'; Cimex8: 5'-CTG TCT GTC ACG CTG ATG CC-3') und stromabwärts des Sequenzanfangs des Klons CH3 (Cimex3: 5'-TTT GCT GCC TTC GAT CTG G-3'; Cimex4: 5'-CAA TCA GGT CGG ATA GCT CC-3') abgeleitet. Versuche, den fehlenden Startbereich der humanen Ca^{2+} -NDPase mittels PCR zu amplifizieren, schlugen fehl. Zum einen zeigte sich anhand der mittlerweile klonierten und in den Datenbanken seit Anfang Dezember 2001 zugänglichen humanen mRNA-Sequenz (Accession-Nr. BC017655), dass stromaufwärts des ersten Startcodons eine Splice Stelle lag und somit die Primer Cimex6 und Cimex7 wirkungslos waren. Zum anderen waren aufgrund des hohen GC-Gehaltes im vorderen Teil der Sequenz sowohl Primerauswahl als auch die PCR als solches extrem problematisch. Desweiteren waren Versuche mittels einer biotinylierten Sonde unter Verwendung des ClonCapture[®]-Kits die gesuchte vollständige cDNA aus der Humane-Gehirn-cDNA-Bank anzureichern ebenfalls erfolglos.

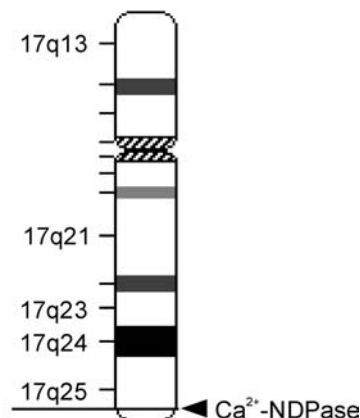


Abbildung 3.1.1: Chromosomale Lokalisierung der humanen Ca^{2+} -NDPase. Mit Hilfe der Genomic BLAST-Dienste des NCBI konnte die humane cDNA auf dem Chromosom 17 in Band q25 lokalisiert werden. Die einzelnen Bands des Chromosoms sind durch unterschiedlich gefärbte Bereiche dargestellt.

```

1      cagccaagcccagccaagcccagccaagccccgcgatcgcgggcaccggagccagcccc
61     gcagcaggaggaccacagagcaccagcctgcatggaacttccttcctcactcagcttccc
121    acgttgccagctgggacaggggagatggagtaattttgcgtggaagacttcacgtctt
181    gccgaatgaaagctcccgcctgtctgtcacgctgatgcccgtgcagctgtctgagcaccg
241    gaatggaatgagctctatgactccctccggatcagtggtgggggaccttcctgtgctggcg
301    tccatgaccaagggcgcggacccccgcttcgcccccgctggaaggatcctgacgttc
361    tttgtgggtgctgccatcctctggtgctctgctcccaccgccccggcccccgaggccc
421    cccaccacaatgcacacaactggaggctcgccaggcgcccgccaactggtacaatgac
481    acctacccctgtctccccacaaaggacaccggctgggattcgggtatcgatcgagtt
541    atcgagacctggacacagagtcaaggggccaagaggaaaacacctggttcagttacctg
601    aaaaagggtacctgacctgtcagacagtgggGACAAGGTGGCCGTGGAATGGGACAAA
661    GACCATGGGGTCTTGAGTCCCACCTGGCGGAGAAGGGGAGAGGCATGGAGCTATCCGAC
721    CTGATTGTTTTCAATGGGAACTCTACTCCGTGGATGACCGGACGGGGTTCGTCTACCAG
781    ATCGAAGGCAGCAAAAGCCGTGCCCTGGGTGATTCTGTCCGACGGCGACGGCACCGTGGAG
841    AAAAGGCTTCAAGGCCGAATGGCTGGCAGTGAAGGACGAGCGTCTGTACGTGGCGGCCTG
901    GGCAAGGAGTGGACGACCACTACGGGTGATGTGGTGAACGAGAACCCGGAGTGGGTGAAG
961    GTGGTGGGCTACAAGGGCAGCGTGGACCACGAGAAGTGGGTGTCCAACATAACGCCCTG
1021   CGGGCTGCTGCCGGCATCCAGCCGCCAGCTACCTCATCCATGAGTCTGCCTGCTGGAGT
1081   GACACGCTGCAGCGCTGTTCTTCTGCCGCGCCGCGCCAGCCAGGAGCGCTACAGCGAG
1141   AAGGACGACGAGCGCAAGGGCGCCAACCTGCTGCTGAGCGCTCCCTGACTTCGGCGAC
1201   ATCGCTGTGAGCCACGTCGGGGCGGTGGTCCCCACTCACGGCTTCTCGTCTTCAAGTTC
1261   ATCCCCAACACCGACGACCAATGCTGGCCCTCAAATCCGAGGAGGACAGCGGCAGA
1321   GTCGCCTCCTACATCATGCGCTTACGCTGGACGGGCGCTTCTGTTGCCGAGACCAAG
1381   ATCGGAAGCGTGAATACGAAGGCATCGAGTTCATTTAACTCAAAACGGAACACTGAGC
1441   AAGGCCATCAGGACTCAGCTTTTATAAAAAACAAGAGGAGTGCACCTTTGTTTTGTTTTGT
1501   TCTTTTTGGAAGTGTGCCTGGGTGGAGTCTGGACAGGGAGCCAGTCCCGGGCCCCAT
1561   AGTGGTGCGGGCACTGGACCCCCGGGCCCCACGGAGGCCGCGGTCTGAAGTCTTTCCAT
1621   GCTGCCATCTGGTGGTGATTTTCGGTCACTTCAGGCATTGACTCAAGGCCGCTGCTAACTGG
1681   CTGGGTCGTTTCTTCCATCCGACCTCGTTTCTTTCTTTCTATGTTCTTTGTTTCAGTG
1741   AATATCCCTAGAGCTCCTACCATATGTCAGGCCCTATGCCTCACCCTGAGAACGCAGTGA
1801   GCATGAGGTGGACCTGTTTGTGGGAACCCAGGTCACCCCTTTTCTTCTACTCTGTG
1861   CCTGGAGCATCATGTCCACCCCTGCAGATCCTTGGAAAAGAAAATGTTTATGTTGCAGGG
1921   TATTGCATGGTCACGAGTGAGGGCAGGCCCTGGGGACACATCTGCCACAGCTGCACAG
1981   GCCAGGGCGCAGGCACATCTGTTGGTTCTCAGGCCTCAGATAAAACCATCTCCGCATCAT
2041   ATGGCCAGTGACCGCTTTCTCCCTTCAAGAAAATCTGTGGCTGTGCAGTACTTTGAAGT
2101   TTTAATTATTAACCTGCTTTAATTAAGCAGTTTCTTTCTTATAAAGTGGAAATCACCAA
2161   ATCTTATCACACAGAGCACAGTCTGTAGTTACCCAGCCCGCTCCAGCAGTGCGGGAGAT
2221   TGTAAGGAAGCGGTGGCGGCTGGTGAAGCAAGTCTCACATGTCGGCGTTCTTGGCCAATG
2301   GATACAAAGATAAAGAAAATGTTGCCTTTTCTAGGAAGTGTGAGAAATCCTCATGCCTT
2361   TCAAGACTTCTGTGAATGACTTGAATTTTTTATTCCCTGCCTAGGGTCTGTGAACGAGGC
2421   CTGTCTCTTCCCTGGGGTTTCTTCCATGGCCTTTATTTCTCTCTTCCAGTGGGAGTTT
2481   TGCAGGCTCTTCTCTGTGAAACTTTCAGAGCGTTGGCTGGGCCTCGGCTTCGCTGGAGT
2541   GTACTCCAGGGTGAAGGCAGAGTGGGATTTGAGACCCAGGTTAGGCACGACCCAGGCTGA
2601   GAAGGGACGTTTCCATCATTACAGTGCCCTCCCCACAGCACTACCTACCCCGACCCCC
2661   ACCCTCACTCCTACCCACCCCGCATCGTCAGGGGTGCCACGGTGGGCCGAGGGTGCC
2721   GGCTCTGGCTGTCCCTGTGCCGTCCCTCACAAACCTCTCCCCCTTTGAAACTCAAGCAC
2781   AGCTGCGAGGAGGGCAGCGAGGAGGGACCCCTCTCTCATGGTTGTCTCTTTCCCCCGCTA
2841   TGTCATAGGTAGTGGAGGAAGCGAAGGAAGTGAACGCTAAATGTGACGCATTCTGAAGA
2901   GCTCAGCTGTCACCGGGCATAGCCTGGAAGCCCCAAGTCTGTTCTGACTTTGCGCTGGCTG
2961   TCTCCTTGACCCGCCTCCTAGATCATTTGTCCTTGATGTCCAGGCTGGGTCAATTTAAATA
3021   GAGATGCAATCAGGAAGTTGGGGGACTTGGGACTGTGGCTGAATTGAGACCTTGTCTGAT
3081   GTATTCATGTCAGCACGTGAGTCACGCCAGGTGCCCGGAAGCAGCCTTTCGCTATAGG
3141   CAGTGATTTGCGATTACTTTAAAGCTCACCTTTTTTCTTCCCTCTCTGTTTCGCTGCTGT
3201   CAGCATAATGATTGTGTTCCCTTCCCTATGGGATCCATCTGTTTTGTAAACAATAAGCGT
3261   CTGAGGGAGTGTAACCAAAAAA

```

Abbildung 3.1.2: cDNA-Sequenz der humanen Ca^{2+} -NDPase. Kombination der Sequenz des Klons CH3 (Accession-Nr. AJ312208, in Großbuchstaben) und der humanen cDNA-Sequenz (Accession-Nr. BC017655, in Kleinbuchstaben). Die drei Startcodons innerhalb des Leserasters sowie das Stopcodon sind fett und unterstrichen dargestellt. Die Splicestellen wurden umrandet. Die Lage der PCR-Primer Cimex8, Cimex5, Cimex4 und Cimex3 wurde durch graue Hinterlegung, in dieser Reihenfolge beginnend am Transkriptionsstartpunkt, markiert.

3.2 Klonierung, Expression und funktionelle Charakterisierung der Ca^{2+} -NDPase aus *Rattus norvegicus*

3.2.1 Amplifikation und Charakterisierung der Ratten- Ca^{2+} -NDPase cDNA

Die komplettierte hypothetische Aminosäuresequenz der humanen Ca^{2+} -NDPase diente als Suchvorlage in der Maus-EST-Datenbank des NCBI. Ausgehend von den EST-Sequenzen (Accession Nr. BF582504 und AI645519) sowie der später veröffentlichten Maus mRNA-Sequenz (Accession Nr. AK006565), welche 111 bp zusätzlich innerhalb der codierenden Sequenz aufwies, wurden PCR-Primer (mCimex1: 5'-TAC CAG ATC GAA GGC ACC AA-3'; mCimex2: 5'-GCA GGC GGA CTC GTG AAT GA-3') um diesen Bereich abgeleitet. Mittels PCR konnte in der cDNA-Bank aus Rattenhirn nur das erwartete 300 bp Fragment, ohne zusätzliche Information innerhalb des codierenden Bereiches, amplifiziert werden. Ein 380 bp Fragment (mCimex3: 5'-TCT CAT TAC AAC GAC ACC TAC C-3'; mCimex4: 5'-ACC CTT CTC CAC AGT TCC-3') diente nach Biotinylierung mittels PCR als Sonde für das ClonCapture-Verfahren, welches jedoch ohne Erfolg blieb. Daher wurden weitere Primer aus der Maus-Sequenz abgeleitet (mCimex5: 5'-CCA TAC AGG TCC TGT CCA GAG TGC-3'; mCimex6: 5'-GGT TTT TAT GAG TCC TGG TGT AAC ACA GC-3'). Unter Verwendung des Primers mCimex5, welcher stromaufwärts des Startcodons lag, und des Primers mCimex6, welcher stromabwärts des Stop-Codons lag, konnte aus der Rattenhirn pCMV Sport2 cDNA-Bank ein 1,3 kb Fragment amplifiziert werden (**Abb. 3.2.1.1**).

Dieses 1,3 kb PCR-Fragment enthielt einen offenen Leserahmen von 1209 bp, welcher für 403 Aminosäurereste codierte. Die abgeleitete Aminosäuresequenz hat ein errechnetes Molekulargewicht von 45,7 kD und einen berechneten isoelektrischen Punkt von 6,2. Die Sequenz (**Abb. 3.2.1.2**) enthielt eine mögliche N-Glycosylierungsstelle (N⁹⁰) und einen einzigen Cysteinrest (C²⁸⁹).

Desweiteren fanden sich, ebenso wie in der humanen Sequenz, drei mögliche Startcodons innerhalb des Leserasters stromaufwärts des zweiten N-terminalen hydrophoben Bereichs. Keines dieser Startcodons wies eine Kozak-Konsensussequenz (Kozak M., 1999 und 1996) auf.

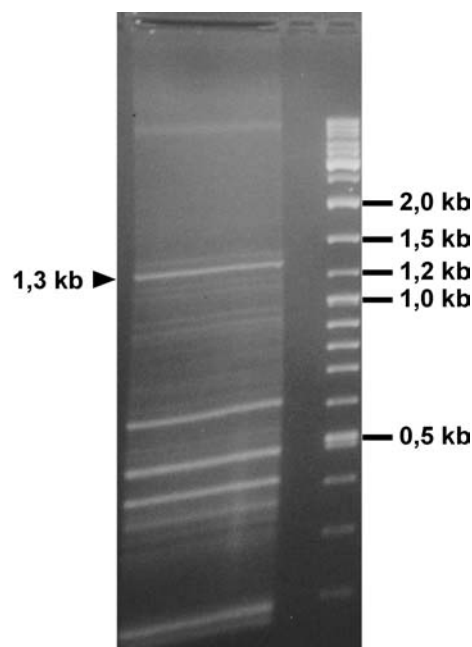


Abbildung 3.2.1.1: Amplifikation der Ca²⁺-NDPase der Ratte mittels PCR. Unter Verwendung der PCR-Primer mCimex5 und mCimex6 konnte ein 1,3 kb Fragment amplifiziert werden, welches den offenen Leserahmen der Ca²⁺-NDPase der Ratte enthielt.

```

ccatacaggtcctgtccagagtgcagttctc M P I Q P F D Q R E W N E P M H S L R I 90
ATGCCCATCCAGCCCTTTGACCAGCGGGAATGGAATGAGCCTATGCACTCCCTCCGGATC
S V G G L P V L A S M T K A T D P R F R P R W R V I L T S F 180
AGTGTAGGGGGCTTCCAGTGTGGCATCCATGACCAAGGCCACGGACCCCTCGCTTCCTCCCGTGGAGGTGATTCTGACGTCCCTTT
V G A A L L W L L Y S H H Q T P V S G R P P I H N A H N W R 270
GTGGGTGCTGCCCTCCTCTGGGTGCTGTATTCCACCATCAGACCCAGTATCGGGCAGGCCCCCATCCACAACGCACAACTGGAGG
L R Q E R I S Q Y N D T Y P L S P P Q R T P G G I R Y R I A 360
CTCAGGCAGGAGCGCATCTCTCAATACAATGACACCTACCCCTATCACCCACAGAGGACTCCAGGTGGGATTTCGTACCGAATTGCA
V I A D L D T G S K A Q E E N T W F S Y L K K G Y L T L S D 450
GTCATTGTGACTTGGACACGGGGTCCAAGGCCAGGAGGAGAACACTTGGTTTAGTTACCTTAAGAAAGGCTACCTGACCTGTCTGGAC
S G D R V S V E W D K D R G V L E S H L A E K G R G M E L S 540
AGTGGGACAGGGTCAGTGTGGAGTGGGATAAGACCGTGGAGTCTTGGAGTCCCACCTGGCAGAAAAGGGCGGGCATGGAGCTCTCG
D L I V F N G K L Y S V D D R T G V I Y Q I E G T K A V P W 630
GACCTGATCGTCTTCAACGGGAACTCTACTCTGTGGATGACCGCACGGGGTCTATACCAGATCGAAGTACCAAAGCAGTGCCTTGG
V I L S D G D G A V E K G F K A E W L A V K D E H L Y V G G 720
GTGATCCTTCTGATGGCGATGGAGCTGTGGAGAAGGGCTTCAAAGCGGAATGGCTGGCTGTGAAGGACGAGCATCTGTACGTGGGTGGC
L G K E W T T T T G E V V N E N P E W V K V V G H R G S V E 810
CTGGCAAGGAGTGGACGACCACAACGGGGGAGGTGGTGAACGAGAACCTGAGTGGGTGAAGTGGTGGGCCACAGGGGAGTGTGGAA
H E N W V S S Y N A L R A A A G I Q P P G Y L I H E S A C W 900
CACGAGAAGTGGGTGTCCAGTACAATGCCCTGAGAGTGCCTGAGGATCCAAACCGCAGGCTACCTCATTCATGAGTCCGCCTGCTGG
S D T L Q R W F F L P R R A S H E R Y S E R E D E R K G S N 990
AGCGACACACTGCAGCGTGGTTCTTCTGCCACGACGGGCGAGCCACGAGCGCTACAGCGAAAGGGAGGACGAGCGAAAGGGCAGCAAC
L L L S A A Q D F R D I S V R Q V G A L V P T H G F S S F K 1080
CTGCTGCTGAGCGCAGCCAGGACTTCAGGGACATCTCTGTGAGGCAAGTGGGGGCGCTGGTCCCCACCATGGCTTCTCATCTTCAAG
F I P N T D D Q I I V A L K S E E D N G R I A T Y V M A F T 1170
TTCATCCCCAACCGGATGACCAGATCATCGTGGCTCTCAAGTCAGAAGAGGACAATGGCAGGATTGCCACCTATGTCATGGCCTTTACG
L D G R F L L P E T K I G S V K Y E G I E F I * 1259
CTGGACGGCGGCTTCTGCTTCCAGAGACCAAGATCGGCAGTGTGAAGTATGAAGGAATAGAATTATCTtagagtaagcttgacccca

```

Abbildung 3.2.1.2: cDNA und abgeleitete Proteinsequenz der Ca²⁺-NDPase der Ratte. cDNA-Sequenz der Ca²⁺-NDPase der Ratte (Accession-Nr. AJ312207). Die drei möglichen Startcodons innerhalb des Leserasters wurden grau hinterlegt und umrandet. Die mögliche N-Glycosylierungsstelle wurde mit einer schwarzen Pfeilspitze markiert. Die beiden hydrophoben Bereiche nahe des N-Terminus wurden mit einem grauen oder schwarzen Balken unterstrichen. Das mögliche ER-Retentions/Rücktransport-Signal wurde umrandet und die mögliche Spaltstelle bei der Nutzung des dritten Startcodons wurde mit einer weißen Pfeilspitze markiert.

Zur Identifizierung bekannter Proteinmotive wurde die 403 Aminosäurereste lange Sequenz mit der PROSITE-Datenbank (Bairoch, A. et al., 1997) verglichen. Es fanden sich Konsensussequenzen für zwei cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase-Phosphorylierungsstellen, sechs Casein Kinase II-Phosphorylierungsstellen und zwei N-Myristoylierungsstellen (**Tab. 3.2.1.1**).

Proteinmotiv	Aminosäure
N-Glycosylierungsstelle: N-{P}-[ST]-{P} (PROSITE-Motiv: PS00001)	N ⁹⁰
cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase-Phosphorylierungsstellen: [RK](2)-x-[ST] (PROSITE-Motiv: PS00004)	S ³⁰⁵ S ³¹⁹
Proteinkinase C Phosphorylierungsstellen (PROSITE-Motiv: [ST]-x-[RK]; PS00005)	S ¹⁷ S ⁶⁸ S ³¹⁰ S ³³³ S ³⁴⁸ S ³⁹⁴
Caseinkinase II Phosphorylierungsstellen: [ST]-x(2)-[DE] (PROSITE-Motiv: PS00006)	T ¹³⁷ S ¹⁸¹ S ²⁰⁴ T ²³⁸ S ³¹⁰ S ³⁶⁵
N-Myristoylierungsstellen: G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P} (PROSITE-Motiv: PS00008)	G ¹⁵⁴ G ¹⁶⁶

Tabelle 3.2.1.1: Proteinsäuremotive innerhalb der Ca²⁺-NDPase Sequenz der Ratte.

Die durch Vergleich der Proteinsequenz mit der PROSITE-Datenbank erhaltene Proteinmotive wurden in PROSITE-Syntax (Anhang A.8) dargestellt und die möglicherweise modifizierten Aminosäurereste wurden angegeben.

Zwischen dem dritten Startcodon und dem zweiten N-terminalen hydrophoben Bereich konnte ein ausgedehntes RXR-Motiv identifiziert werden (**Abb. 3.2.1.2**, Aminosäurepositionen 38 - 44). Dieses RXR-Motiv (R-{DE}-R) fungiert möglicherweise als ER-Retentions/Rücktransport-Motiv (Bichet D. et al., 2002; Scott D.B. et al., 2001; Margeta-Mitrovic M. et al., 2000; Xia H. et al., 2001 und Zerangue N. et al., 1999).

3.2.1.1 Membrantopologie der Ca²⁺-NDPase

Zur Identifizierung möglicher Transmembrandomänen wurde ein Hydropathie-Plot der Aminosäuresequenz (Kyte J. et al., 1982) durchgeführt. Der Plot zeigte zwei N-terminale hydrophobe Bereiche (**Abb. 3.2.1.3 A**) mit unterschiedlicher Hydrophobie. Der erste hydrophobe Bereich zeigte eine deutlich geringere Hydropathie als der zweite. Der Wert des ersten Bereiches liegt gerade am Grenzwert zur sicheren Abschätzung einer Transmembrandomäne. Daher wurde die Sequenz zur Vorhersage der Membrantopologie einer Reihe von unterschiedlichen Vorhersage-Algorithmen übermittelt (z.B. TopPred II, **Abb.3.2.1.4**). Aus diesen resultierten zwei alternative

Möglichkeiten der Membrantopologie der Ca^{2+} -NDPase (**Abb. 3.2.1.3 B und C**). Im ersten Modell weist das Enzym zwei N-terminale Transmembrandomänen auf (**Abb. 3.2.1.3 B**), wobei sich sowohl der N- als auch der C-Terminus außerhalb des Zytoplasmas befinden. Das zweite Modell zeigt nur eine N-terminale Transmembrandomäne und zwar im Bereich des stark hydrophoben Bereiches (**Abb. 3.2.1.3 C**). Der erste, schwächere, hydrophobe Bereich ist möglicherweise mit der Membran assoziiert. Der N-Terminus liegt im Zytoplasma, somit ist das Enzym in diesem Modell ein Typ II-Transmembranprotein. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Vorhersagequalitäten der unterschiedlichen Algorithmen, in einem unabhängigen Test (Möller S. et al., 2001 und 2002), erscheint das Modell mit nur einer Transmembrandomäne am wahrscheinlichsten.

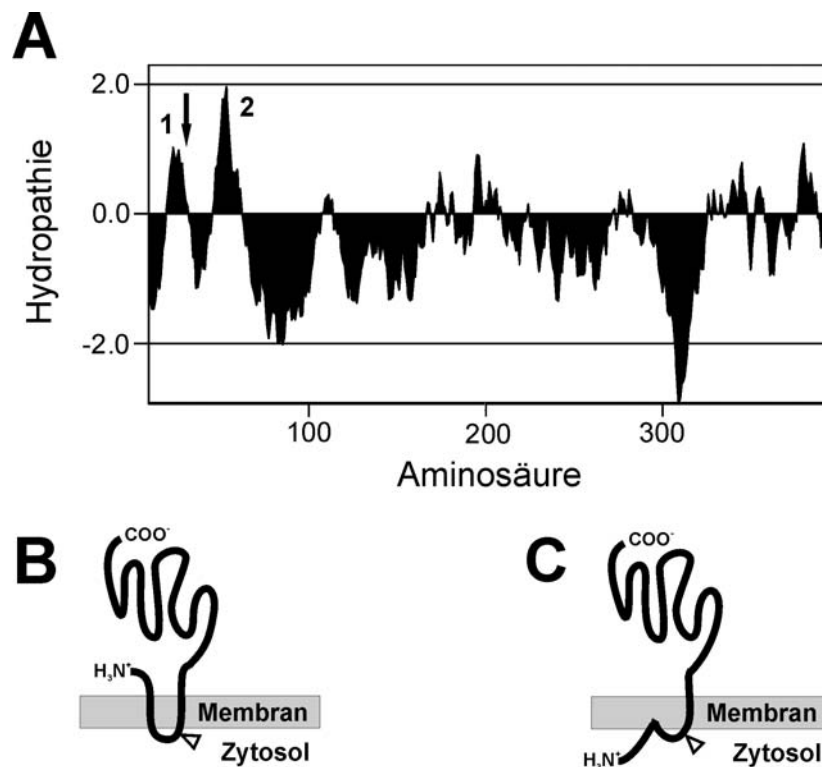


Abbildung 3.2.1.3: Hydropathie-Plot und Membrantopologie der Ca^{2+} -NDPase.

A. Der Hydropathie-Plot erfolgte nach der Methode von Kyte und Doolittle (Fenstergröße: 11 Aminosäurereste). Die zwei hydrophoben Bereiche wurden mit 1 (schwächerer hydrophober Bereich) und 2 (stark hydrophober Bereich) markiert. Der Pfeil markiert die Position des dritten Startcodons innerhalb des Leserasters. **B.** und **C.** zeigen die beiden alternativen Membrantopologie-Modelle der Ca^{2+} -NDPase beginnend mit dem ersten Startcodon.

Total of 2 structures are to be tested

Candidate membrane-spanning segments:

Helix	Begin	End	Score	Certainty
1	15	35	0.622	Putative
2	43	63	1.574	Certain

HEADER	START	STOP	LEN	PROB	HP	DARGLYS	DCYTEXT	DNCHARGE	DNNEGPOS
TOPOLOGY	1			1.00		8.00	-0.97	3.00	-0.27
TOPOLOGY						N-in	N-in	N-in	
CYT_LOOP	1	42	42			7.00	(0.24)		
TRANSMEM	43	63	21	1.00	1.57				
EXT_LOOP	64	403	340			(40.00)	0.97		

HEADER	START	STOP	LEN	PROB	HP	DARGLYS	DCYTEXT	DNCHARGE	DNNEGPOS
TOPOLOGY	2			0.05		-2.00	0.97	-5.00	0.20
TOPOLOGY						N-out	N-out	N-out	
EXT_LOOP	1	14	14			2.00	(-0.11)		
TRANSMEM	15	35	21	0.05	0.62				
CYT_LOOP	36	42	7			5.00	(-0.52)		
TRANSMEM	43	63	21	1.00	1.57				
EXT_LOOP	64	403	340			(40.00)	0.97		

Abbildung 3.2.1.4: TopPred II-Vorhersage der Ca^{2+} -NDPase-Membrantopologie. Membrantopologie-Vorhersage mit Hilfe des TopPred II-Algorithmus (Claros M.G. et al., 1994) unter Verwendung der Standardeinstellungen für Eukaryoten und der GES-Hydropathie-Skala.

3.2.1.2 Signalpeptidvorhersage der möglichen Translationsprodukte der Ca^{2+} -NDPase

Die Sequenz der Ca^{2+} -NDPase wies drei mögliche Startcodons innerhalb des Leserasters auf (**Abb. 3.2.1.2**). Keines dieser Startcodons stellte eine Kozak-Sequenz (Kozak M., 1999, 1996) zur optimalen Translationsinitiation dar. Daher wurden die Proteinsequenzen der drei möglichen Translationsprodukte mit Hilfe des SignalP 2.0-Algorithmus (Nielsen H. et al., 1999, 1997) untersucht. Für die ersten beiden theoretischen Translationsprodukte wurde ein Signalanker mit 99 %iger bzw. 68 %iger Wahrscheinlichkeit vorhergesagt (**Tab. 3.2.1.2**). Bei der Nutzung des dritten Startcodons änderte sich jedoch die Vorhersage zugunsten eines Signalpeptids mit einer Wahrscheinlichkeit von 66 %, und einer Spaltwahrscheinlichkeit von 50 % am Arginin⁷⁰, ausgehend vom ersten Startcodon. Aufgrund dieser Vorhersagen und der Tatsache, dass die charakterisierten Insekten-Apyrasen der *Cimex*-Familie (Valenzuela J.G. et al., 2001, 1998) allesamt löslich sind, wurde zusätzlich eine 5'-trunkierte Version beginnend mit dem dritten Startcodon innerhalb des Leserasters kloniert.

Startcodon	Vorhersage	Signalpeptid-Wahrscheinlichkeit	Signalanker-Wahrscheinlichkeit	Spaltstelle Wahrscheinlichkeit
1. ATG M ¹	Signalanker	0,3 %	99,0 %	R ⁷⁰ 0,2 %
2. ATG M ¹⁵	Signalanker	31,8 %	68,0 %	R ⁷⁰ 24,3 %
3. ATG M ³¹	Signalpeptid	65,6 %	34,3 %	R ⁷⁰ 49,5 %

Tabelle 3.2.1.2: Signalpeptid-Vorhersage der theoretischen Translations-Produkte der Ca²⁺-NDPase. Die Proteinsequenzen der drei theoretischen Translationsprodukte der Ca²⁺-NDPase wurden mit Hilfe des SignalP 2.0-Algorithmuses (Nielsen H. et al., 1999, 1997) analysiert. Die Nummerierung der Aminosäurepositionen erfolgte ausgehend von dem ersten Startcodon

3.2.1.3 Beziehung der Ca²⁺-NDPase zu anderen homologen Sequenzen

Das homologe Enzym der Maus konnte auf dem Chromosom 11 in Band E2 (Accession-Nr. NT031417) lokalisiert werden. Der codierende Bereich der murinen mRNA setzt sich, wie im Falle der humanen mRNA, aus drei Exons zusammen. Die Exonstruktur des codierenden Bereiches ist mit der des humanen Homologs identisch. Durch Analyse der murinen mRNA-Sequenzen BC020003 und AK006565, sowie der murinen EST-Datenbank des NCBI konnte die Sequenz AK006565 als Splicevariante identifiziert werden. Sie enthält zwischen dem ersten und dem zweiten Exon des codierenden Bereiches der Ca²⁺-NDPase zusätzlich 111 bp. Ob diese Splicevariante der Maus, welche 37 zusätzliche Aminosäurereste aufweist, funktionell aktiv ist oder gar eine andere Funktion aufweist, ist unklar. Denn weder für die Ca²⁺-NDPase der Ratte noch für das humane Homologe konnten Hinweise auf eine ähnliche Splicevariante in den Datenbanken des NCBI gefunden werden. Deweiteren blieben Versuche, ein Insert-tragendes DNA-Fragment, zu dem erwarteten Insert-freien 300 bp Fragment der Ratte, mittels PCR und den Primern mCimex1 und mCimex2 zu amplifizieren, wie bereits erwähnt erfolglos.

Organismus	Identität auf Proteinebene
<i>Rattus norvegicus</i>	100%
<i>Mus musculus</i>	95%
<i>Homo sapiens sapiens</i>	86%
<i>Silurana tropicalis</i>	71%
<i>Caenorhabditis elegans</i>	42%
<i>Drosophila melanogaster</i>	44%
<i>Anopheles gambiae</i>	42%
<i>Cimex lectularius</i>	37%
<i>Phlebotomus papatasi</i>	31%
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	30%

Tabelle: 3.2.1.3: Identität homologer Sequenzen zur Ca^{2+} -NDPase der Ratte. Identitäten unterschiedlicher homologer Proteinsequenzen zur Ca^{2+} -NDPase der Ratte. Erläuterungen zu den Sequenzen, sowie GenBank® Accession-Nr. der Sequenzen siehe Abbildungslegende 3.2.1.7.

Die vollständige Proteinsequenz der Ca^{2+} -NDPase der Ratte, beginnend mit dem ersten Startcodon, wies auf Proteinebene eine 95 %ige Identität zum murinen Homologen bzw. eine 86 %ige Identität zum humanen Homologen auf (**Tab. 3.2.1.3**). Sogar im Krallenfrosch *Silurana tropicalis* fand sich ein homologes Protein mit 71 % Identität zum Protein der Ratte. Die charakterisierten sekretierten Apyrasen von *Cimex lectularius* und *Phlebotomus papatasi* sowie die theoretische sekretierte Apyrase von *Lutzomyia longipalpis* wiesen jedoch deutlich geringere Identitäten auf. Sie lagen nur zwischen 30 und 37 %. In der Genom-Datenbank der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* fand sich keine homologe Sequenz.

Das Sequenz-Alignment von zehn ausgewählten Homologen Vertebraten- und Invertebratensequenzen verdeutlicht den hohen Grad der Homologie unter diesen Sequenzen (**Abb. 3.2.1.5**). Es fanden sich acht konservierte Regionen innerhalb dieser Sequenzen, wovon sich eine direkt am C-Terminus befand. Diese acht konservierten Bereiche umfassten folgende Aminosäurepositionen der Ca^{2+} -NDPase der Ratte: 107 – 116, 164 – 192, 199 – 232, 281 – 291, 297 – 305, 315 – 323, 345 – 367 sowie 396 – 402. Alle Vertebratensequenzen enthielten die drei möglichen Startcodons innerhalb des Leserasters sowie das im Zytosol liegende erweiterte RXR-Motiv nach dem dritten Startcodon, unmittelbar vor dem zweiten hydrophoben Bereich. Dieses RXR-Motiv wurde von zwei Prolinresten flankiert (**Abb. 3.1.2.6**), wodurch die beiden Argininreste eine besonders exponierte Position einnehmen dürften (**Abb. 3.1.2.7**).

```

MM MPIQPFDDQREWNEPMSLSRISVGGLEVLASMTKATDPRFRPRWRVILTSFVGAALLWLLYSHHQGPVPGRPPTHNAHNWR
RN MPIQPFDDQREWNEPMSLSRISVGGLEVLASMTKATDPRFRPRWRVILTSFVGAALLWLLYSHHQTPVSGRPPTHNAHNWR
HS MPVQLSEHPWENESMSLSRISVGGLEVLASMTKAADPRFRPRWKVILTFVGAAILWLLCSHR--PAPGRPPTHNAHNWR
ST ---MKSSHVECKDSMSPLRISVGGLEVLASMTKATDPRFRPRWGAILLSGVGVALLLFLLCYHRSSGP-RTAISNAHNWR
CE -----MTQESNSN-----ENFLFGFVTAIAFY-----SGTQEN
DM -----MYLRDWRSAIRTP-TYRIGNRTVRFNVHF--ALLIVCAFVLVLLFYFARQGSSSSDGYWLRRSYTDA
AG -----MYLRDWRKALRSPSYRIGNRTIRLQVHFTVLAALCAFLLLVYISSSPSSLLS-DG---PRTNSFL
CL -----MRSSYRVGN-PIRFQPTNVVGLLLSLVLSFMIIV-----QSYELG
LL -----MFLKWVVCATFATV-----
PP -----MFLKFCIVAFATC-----
1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....

                xxxxxxxx
MM LSQQ---RIS-HYNDTYPLSPQRTPG-GIRYRIAVIADLDGSKAQEE---NTWFSYLLKKGYLTLSDSGDRVSVENDKD
RN LRQE---RIS-QYNDTYPLSPQRTPG-GIRYRIAVIADLDGSKAQEE---NTWFSYLLKKGYLTLSDSGDRVSVENDKD
HS LGQA---PAN-WYNDTYPLSPQRTPA-GIRYRIAVIADLDGSKAQEE---NTWFSYLLKKGYLTLSDSGDKVAVENDKD
ST MGH---VAEGLYNDTYPLTPELRTEE-GLRYLIATADLDGDSSTKA---NTWISYLLKRGYLTLSGDFVSVENEKE
CE KSSE---QEE-HINHANLYSVKKFDDG-AKENSTIMLITDLDHDSK--DG---KKWKSLSRSGFLKVSADHKKHADIHFDDK
DM RSLDNGGPVQYANATYPLTSMVLRRGVINRYRIAMADLDGSSKVSKGDSSTWRSYLLKKGYLTITVARSETQISWDDG
AG RTS-----AIVYNHTYPLTSEIVSSG-IYSFRVGIADLDGNSALKK---NQWGSYLLKGCLSFIPKRSITVSWDEG
CL HASG-----ETNANSKYPLTTE-VEENLKVRFKIGVISDDKNAVSKDE--SNTWVSTYLTITLEWEKSTDKITVQWDDG
LL -----FLVGVSAAPPGVEWHFGLIADMDKKSIAS-DK--TFNSVLKIDELRHNTKTDQYIYVRSRV
PP -----LSINLSEGAERSGTINFTIADLDKKSISPKND--NNYKSIYKVLELIEVG--DKYSVYKMKKE
81.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....

                xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
MM -HGVLESHLAENKGRGMELSDLIVFNGKLSVDDRTGVVYQIE-GTKAVPWVILSDGDTVEKGFKAEWLAVKDEHLYVGG
RN -RGVLESHLAENKGRGMELSDLIVFNGKLSVDDRTGVVYQIE-GTKAVPWVILSDGDTVEKGFKAEWLAVKDEHLYVGG
HS -HGVLESHLAENKGRGMELSDLIVFNGKLSVDDRTGVVYQIE-GSKAVPWVILSDGDTVEKGFKAEWLAVKDEHLYVGG
ST -DIVLETHLAENKGRGMELSELIVFNGKLSVDDRTGVVYRIE-GSKAIPWVILPDGDTVEKGFKAEWLSVKDEQLYVGG
CE SEYYVDNTNIAAGGRAMELSDLIVFNGKLSVDDRTGLIYQIS-DKKALPWVILNDGPGNVVKGFKCEWITVKTTELIVGG
DM APIVLESFAFALKGRGMELSELVTFNGRLTTFDDRTGLIYETV-NDKPIPWVILLDGDTGHSAGFKAEWATVKEQVLYVGS
AG EAKALQSFAFALKGRGMELSELVVFNGKLTTFDDRTGLVYIE-GEKVI PWVILMDGDTGRTSGFKSEWATVKEQVLYVGS
CL NEKKVKSYSYGRGMELSELVTFNGNLTTFDDRTGLVYILK-DDAVYPWVILADGDKNSGFKSEWATEKAGNLYVGS
LL -KKPVSTRYGFGRGAELSEIVVFNGKLTTFDDKSGITFRITKDGKLPWVILADADGQRPDGFKEWATIKDITVLYVGS
PP -DHEIFTKYAYKGRGAELSEFLIYKWKLTTFDDKSGIVFRITKNADLIPWVILANGNGQDTGFKAEWATIKDKMYVGS
161.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....

                xx                xxxxxxxx                xxxxxxxx
MM LGKEWTTTTTGEVMNENPEWVKVVGHRGSDHENWVSSYNALR-AAAGIRPEGVLTTHESACWSTLQWFEFLPRRASHERY
RN LGKEWTTTTTGEVMNENPEWVKVVGHRGSDHENWVSSYNALR-AAAGIQPEGVLTTHESACWSTLQWFEFLPRRASHERY
HS LGKEWTTTTTGDVVNENPEWVKVVGKYSVDHENWVSSYNALR-AAAGIQPEGVLTTHESACWSTLQWFEFLPRRASHERY
ST LGKEWTTTTSGVVLNENPEWVKVIGPRGDIQHNNWVSSYNLLR-SAAGIEPEGVLTTHESACWSTLQWFEFLPRRASHERY
CE LGKEWTTTIDGVYNDHPMMVKHVSAGHWHHENMKDVYIRVR-RAAGIEPEGVLTTHESACWSTLQWFEFLPRRASHERY
DM MKKEWTTTSGDFENNPMYVKAITPSCGVRSNLNWDNFKQLRLQSMQITWEGVMMHESGTWSEERNRWFEFLPRRASHERY
AG MKKEWTTTSGDFETHPMYVKAITVHGEVYHLLTWINHYKAIR-KAIGIEWEGVMMHESGAWSEVHREWFELPRRASHERY
CL SGKEWTTTKEGTIENYPMYVWMINKNGEVTSLNWTINYEKIR-SSMNITFEGVMMHESACWSTLQWFEFLPRRASHERY
LL TGM-----LKFTS--SLWVKKITKDGVTTSHTDWDKRYKIL-KALNMPN-GEVWHEAVTWSFPRKQWVEMPRKCSRHPF
PP TGISTEDTKTGKLSN-SLWIKEDQDGKQSLDMKEQYDKIK-SAMKIPN-GFVWHEAVNWSKLKNQWFEFLPRRASHERY
241.....250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....

                xxxxxxxx                xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
MM SEKDDERKGSNLLLSAAQDFRDISVRQVG-TLIF-THGFSSFKFIENTDDQIIIVALKSEEDNGR-IATYVMAFTLDGRFL
RN SEREDERKGSNLLLSAAQDFRDISVRQVG-ALVP-THGFSSFKFIENTDDQIIIVALKSEEDNGR-IATYVMAFTLDGRFL
HS SEKDDERKANLLLSASPDEGDIAVSHVG-AVVP-THGFSSFKFIENTDDQIIIVALKSEEDNGR-VASYIMAFITLDGRFL
ST SEKDEQRGSNLLLRASPDSDIKMSHVG-TLNP-THGFSSFKFIENTDDQIIIVALKSEEDNGK-VATYITAFITLDGRIL
CE SEADENRGTNVLVIGNEBELTDFEVVRVG-SENNKSRGFAAQFVNTHHOLIIVALKSEEDKGPVASMASVDFIHCNVI
DM NETKDEHMGKNVLVSADSEFTNVETVRDLPENTTTHGFSSFKFIENTDDQIIIVALKSEELNGK-TATFITADIACTIL
AG NETRDEHMGKNVLISDFTQNTIRATELKRNDVFATHGYSRKFIFTSNDEIIVALTSTELNGK-TSSFTISAFITVGEQL
CL DSKKFKETOCANVITSCDDKFKCEPTQIQ-GKTEDKRGFSNKFVETSEDKLIVGLKTVBADDT-TETITAFITADIACTIL
LL QELBERTGCKNIVADENFNDIQIHTQDQPNLASGFSSEFFEGTKNERLLAIRTVEQEDQ-VKTWAVVMDMGTIVL
PP DTKTETITGCKNIIIASNFEIKSTQIKGKSNRAAGFSSEFFEDSDQIIIVALKTIKDDK-TATYITVIDITGRVL
321.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....

                xxxxxxxx
MM LPETKIG-TVKMEGIEFI-----
RN LPETKIG-SVKMEGIEFI-----
HS LPETKIG-SVKMEGIEFI-----
ST LPETKIG-TVKMEGIEFI-----
CE IDEYLLHGPKYKKEGIAFA-----
DM LEETRIETDYKMEGIEFI-----
AG MVEETRIETDYKMEGIEFI-----
CL LEETKID-DHKMEGVDFV-----
LL MYEKELY-DEKMEGLAEPFGG---IKKN-
PP MEEMQIN-SDKMEGVLLKSTEGFLKRSQ
401.....410.....420.....

```

Abbildung 3.2.1.5: Anordnung homologer Sequenzen. Das Sequenzalignment wurde mit dem Programm CLUSTAL X durchgeführt. Mit Hilfe des Programms BOXSHADE wurden die unterschiedlich starken Homologien durch verschiedene Grautöne markiert. Die acht konservierten Bereiche wurden durch ein x für jede Position über den Sequenzen markiert. Erläuterungen zu den Sequenzen, sowie den GenBank® Accession-Nrn. der Sequenzen siehe Abbildungslegende 3.2.1.8.

<i>Rattus norvegicus</i>	37	P-R-F-R-P-R-W-R	44
<i>Mus musculus</i>	37	P-R-F-R-P-R-W-R	44
<i>Homo sapiens</i>	37	P-R-F-R-P-R-W-K	44
<i>Silurana tropicalis</i>	34	P-R-F-R-P-R-W-G	41
Konsensus		P-R-F-R-P-R-W-X	
ER-Motiv		P-R-X-R-P	

Abbildung: 3.1.2.5: Theoretisches ER-Retentions/Rücktransport-Motiv in Ca^{2+} -NDPase homologen Vertebratensequenzen. Die beiden Argininreste dürften aufgrund der flankierenden Prolinreste eine sehr exponierte Position einnehmen. Hierdurch sollte das RXR-Motiv sehr gut für eine Bindung an den COP I-Komplex zugänglich sein.

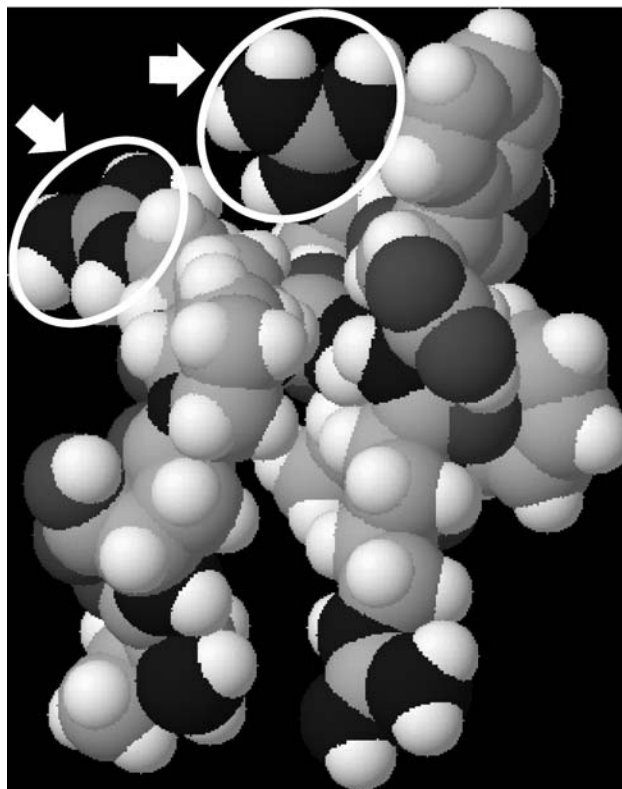


Abbildung: 3.1.2.6: Theoretische räumliche Struktur des RXR-ER-Retentions/Rücktransport-Motiv der Ca^{2+} -NDPase. Ein vereinfachtes Modell der Peptidsequenz TDPRFRPRW wurde mit Hilfe der ChemSketch Freeware V5.11 (ACD, Toronto, Ontario, Kanada) erstellt. Die beiden Prolin-flankierten Argininreste wurden markiert und zeigen eine sehr exponierte Position in großer räumlicher Nähe zueinander. Hierdurch sollte das RXR-Motiv sehr gut zugänglich und für eine Bindung an den COP I-Komplex geeignet sein.

Während die Vertebratensequenzen zwei N-terminale hydrophobe Bereiche aufwiesen, zeigten die Insektensequenzen jeweils nur einen N-terminalen hydrophoben Bereich. Diese strukturellen Unterschiede wurden durch das Dendrogramm (Abb. 3.2.1.8), welches ein Produkt des vorher gezeigten Sequenzalignments war, verdeutlicht. Die Sequenzen ließen sich in zwei Gruppen einteilen. Die erste, die Ca^{2+} -NDPase-Familie wurde aus den Vertebratensequenzen sowie einer Nematodensequenz gebildet. Mit Ausnahme der Nematodensequenz, welche nur 42 % Identität zur Rattensequenz aufwies, zeigten die anderen Mitglieder der Familie untereinander eine sehr große Homologie. Die zweite Gruppe, die *Cimex lectularius*-Apyrase-Familie, bestand aus den Insektensequenzen, welche untereinander deutlich geringere Homologien aufwiesen. So lag z.B. die Identität zwischen den beiden sekretierten Apyrasen der Bettwanze *Cimex lectularius* und der Sandfliege *Phlebotomus papatasi* bei nur 36 %.

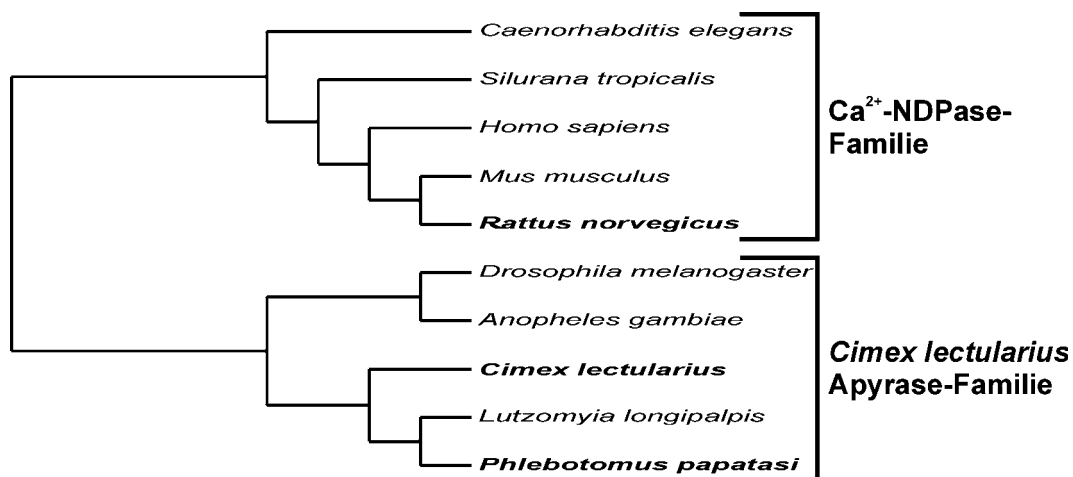


Abbildung 3.2.1.8: Dendrogram homologer Sequenzen der Ca^{2+} -NDPase. Die Visualisierung des Sequenzalignments mit Hilfe des Programms TREEVIEW zeigte, dass die Sequenzen sich in zwei Gruppen unterteilten. Klonierte und funktionell charakterisierte Proteine wurden fett geschrieben. GenBank® Accession-Nr. der Sequenzen: *Rattus norvegicus* (RN) AJ312207; *Mus musculus* (MM) AAH20003; *Homo sapiens* (HS) AAH17655; *Silurana tropicalis* (ST) EST-Konsensussequenz aus AL594966, AL645454, AL629683, AL639153 und AL630505; *Caenorhabditis elegans* (CE) theoretisches Genprodukt U29378; *Drosophila melanogaster* (DM) theoretisches Genprodukt AAF54638; *Anopheles gambiae* (AG) Lesefehler korrigiert, translatiert AJ297933; *Cimex lectularius* (CL) AAD09177; *Lutzomyia longipalpis* (LL) AAD33513; *Phlebotomus papatasi* (PP) AAG17637. Klonierte und funktionell charakterisierte Mitglieder beider Familien wurden durch Fettdruck hervorgehoben.

3.3 Gewebespezifische Expression der Ca^{2+} -NDPase der Ratte

Zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression der Ca^{2+} -NDPase wurden Northern-Blot-Analysen durchgeführt. mRNA aus unterschiedlichen Geweben der Ratte wurde präpariert und nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf eine Nylonmembran mit einer 726 bp langen Digoxigenin-markierten Antisense-Sonde hybridisiert. Es konnten zwei Hauptbanden detektiert werden (**Abb. 3.6**), deren Größe 4,9 bzw. 2,9 kb betrug. Die Intensitäten beider Banden variierte sowohl in den unterschiedlichen Geweben als auch in den relativen Intensitäten beider mRNA Formen untereinander. Das Signal bei 4,9 kb dominierte gegenüber dem 2,9 kb Signal in den meisten der untersuchten Gewebe (Darm, Thymus, Leber, Testis, Muskel und Milz). Dies ist insbesondere im Thymus der Fall. Hier ist nach dem Gehirn die stärkste Ausprägung der längeren Form zu erkennen. Die kürzere mRNA-Form ist besonders stark vorhanden in Gehirn, Lunge und der Niere. Im Testis hingegen ist sie kaum nachweisbar. Die 2,9 kb mRNA-Form entspricht in ihrer Länge in etwa der mittlerweile vollständig vorliegenden humanen mRNA (Accession Nr. BC017655), welche eine Länge von 3,3 kb aufweist.

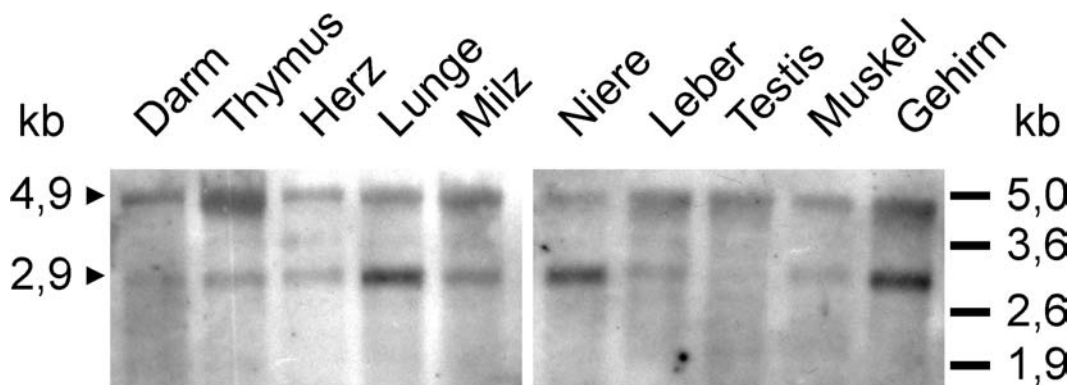


Abbildung 3.3: Northern Blot Analyse der mRNA-Expression der Ca^{2+} -NDPase in unterschiedlichen Geweben der Ratte. mRNA (0,75 μg pro Spur) wurde aus unterschiedlichen Geweben der Ratte isoliert und mit einer 726 bp Digoxigenin-markierten Antisense-Sonde hybridisiert.

3.4 Heterologe Expression der C-terminal mit dem Myc-His-Epitop markierten Ca^{2+} -NDPase in CHO-Zellen

Zur heterologen Expression der C-terminal mit dem Myc-His-Epitop markierten vollständigen Ca^{2+} -NDPase (CERN/pcDNA3.1(-)/Myc His) sowie der 5'-trunkierten Variante (3.ATG/pcDNA3.1(-)/Myc His) wurden CHO-Zellen transient mittels Elektroporation transfiziert. Als Kontrolle dienten Transfektionen mit dem leeren Vektor. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und es wurden grobe Membranfraktionen hergestellt. Die Membranfraktionen, die Ultrazentrifugationsüberstände der Membranfraktionpräparationen sowie die Kulturüberstände der Zellen wurden mittels Western-Blot analysiert. Beide cDNAs wurden exprimiert (**Abb. 3.4**) und die entsprechenden Proteinbanden konnten in den Membranfraktionen identifiziert werden. Im Falle der Transfektion mit der vollständigen cDNA der Ca^{2+} -NDPase konnten zwei immunoreaktive Banden in der Membranfraktion (**Abb. 3.4**, Spur 2) nachgewiesen werden: ein starkes Band bei 49,3 kD, sowie ein deutlich schwächeres Band bei 46,8 kD. Nach Transfektion der CHO-Zellen mit der 5'-trunkierten cDNA der Ca^{2+} -NDPase konnte nur ein Band in der Membranfraktion, auf gleicher Höhe wie das zuvor beschriebene schwächere Band, nachgewiesen werden. Da die berechneten Molekulargewichte der Epitop-markierten Proteine bei 49,6 kD für das vollständige Protein und bei 46,2 kD für die 5'-trunkierte Variante lagen, war es wahrscheinlich, dass das dritte Startcodon im Leseraster in geringem Umfang zur Initiation der Proteintranslation genutzt wurde. Es konnten keine immunoreaktiven Banden in den Ultrazentrifugationsüberständen der Membranfraktionpräparation sowie in den Kulturüberständen der CHO-Zellen nachgewiesen werden. Dies deutete darauf hin, dass keine lösliche und sekretierte Form des Enzyms gebildet wurde.

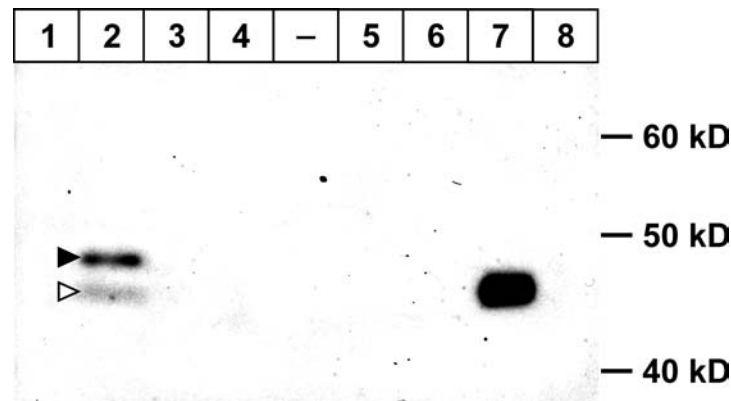


Abbildung 3.4: Western-Blots der Myc-His-Epitop tragenden vollständigen sowie der 5'-trunkierten Ca^{2+} -NDPase. Es wurden jeweils 3,5 μg Protein pro Spur aufgetragen. **Spur 1:** Membranfraktion, Mock-transfizierter CHO-Zellen; **Spur 2:** Membranfraktion, vollständige Ca^{2+} -NDPase; **Spur 3:** Ultrazentrifugationsüberstand der Membranfraktionpräparation, vollständige Ca^{2+} -NDPase; **Spur 4:** Kulturüberstand der CHO-Zellen; vollständige Ca^{2+} -NDPase; **Spur 5:** Kulturüberstand der CHO-Zellen; 5'-trunkierte Ca^{2+} -NDPase; **Spur 6:** Ultrazentrifugationsüberstand der Membranfraktionpräparation, 5'-trunkierte Ca^{2+} -NDPase; **Spur 7:** Membranfraktion, 5'-trunkierte Ca^{2+} -NDPase; **Spur 8:** Membranfraktion, Mock-transfizierter CHO-Zellen. Die schwarze Pfeilspitze markiert das starke Band bei 49,3 kD. Die weiße Pfeilspitze markiert ein schwaches Proteinband von 46,8 kD, welches die gleiche Größe aufweist wie die 5'-trunkierte Form in Spur 7.

3.5 Funktionelle Charakterisierung der Ca^{2+} -NDPase nach heterologer Expression in CHO-Zellen

3.5.1 Substratspezifität der Ca^{2+} -NDPase

Die katalytischen Eigenschaften der Ca^{2+} -NDPase wurden anhand von Membranfraktionen nach heterologer Expression in CHO-Zellen untersucht. Hierzu wurden diese mit der cDNA der vollständigen Ca^{2+} -NDPase (CERN/pCMV Sport1) oder der cDNA der 5'-trunkierten Variante (3.ATG/pCMV Sport1) sowie zur Kontrolle mit dem leeren Vektor transfiziert. Die Transfektion der CHO-Zellen mit einer der beiden Ca^{2+} -NDPase-cDNAs führte in jedem Falle zur Expression katalytisch aktiver Enzyme. Beide exprimierte Formen des Enzyms zeigten im Grunde die gleiche Substratspezifität sowie den gleichen Grad an Produktbildung (Abb. 3.5.1).

Beide Enzyme zeigten die größte Aktivität mit UDP, GDP und IDP. CDP wurde nur zu einem sehr kleinen Teil umgesetzt, während ADP kein Substrat war. Da kommerziell erwerbliche Nukleosid-triphosphate häufig erhebliche Kontaminationen an Nukleosid-diphosphaten enthalten (Trombetta E.S. und Helenius A., 1999; Braun N. et al., 2000a) und die erhaltene Produktbildung in diesen Größenordnungen lag, schien es wahrscheinlich, dass die beobachtete Aktivität auf die in der Probe enthaltenen Nukleosid-diphosphate zurückging und somit die Nukleosid-triphosphate keine Substrate für die Ca^{2+} -NDPase waren. Die untersuchten Nukleosid-monophosphate waren ebenfalls keine Substrate für die Ca^{2+} -NDPase. Somit konnten beide Varianten als NDPase (EC 3.6.1.6) klassifiziert werden.

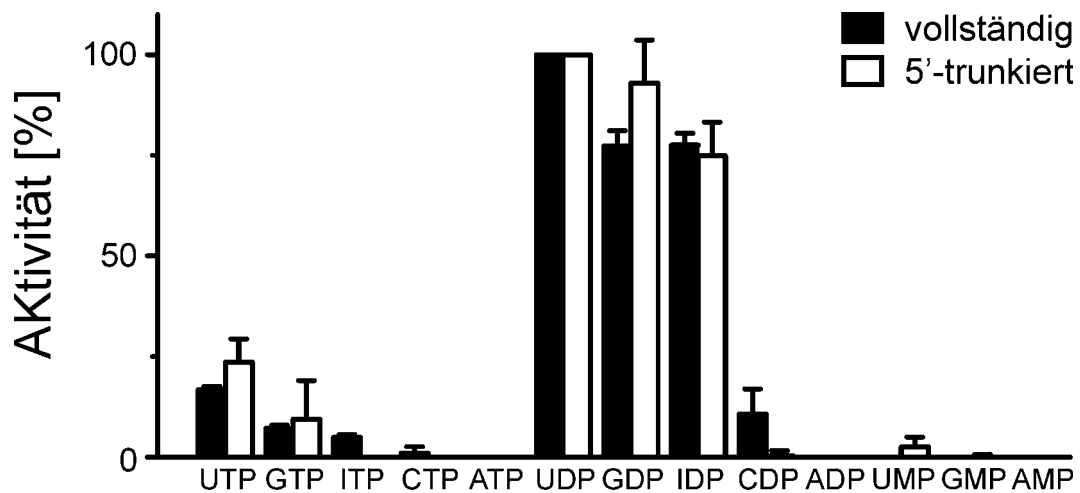


Abbildung 3.5.1: Substratspezifität der Ca^{2+} -NDPase nach heterologer Expression in CHO-Zellen. CHO-Zellen wurden mit der cDNA der vollständigen Ca^{2+} -NDPase oder der cDNA der 5'-trunkierten Variante transient transfiziert. Als Kontrolle dienten Mock-transfizierte Zellen. Zur Aktivitätsmessung wurden grobe Membranfraktionen eingesetzt. Die Substrate wurden in einer Endkonzentration von 0,5 mM und in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 appliziert. Die gemessenen Aktivitäten wurden Mock-korrigiert und auf die UDPase-Aktivität normiert. Die 100 %-Werte entsprechen $73 \pm 3 \text{ nmol P}_i / (10^6 \text{ Zellen} \times \text{min})$ ($\pm \text{S.E.}$; $n = 3$) für die vollständige Ca^{2+} -NDPase, sowie $65 \pm 38 \text{ nmol P}_i / (10^6 \text{ Zellen} \times \text{min})$ ($\pm \text{S.E.}$; $n = 3$) für die 5'-trunkierte Variante.

3.5.2 Abhängigkeit der Enzymaktivität von divalenten Metallkationen

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von divalenten Kationen (Ca^{2+} und Mg^{2+}) wurde anhand von Membranfraktionen nach heterologer Expression der Ca^{2+} -NDPase der Ratte (CERN/pCMV Sport1) in CHO-Zellen untersucht. Membranfraktionen Mock-transfizierter CHO-Zellen dienten als Kontrolle. Als Substrat für die Bestimmung der Ionenabhängigkeit wurde als bestes Substrat UDP gewählt. Die Enzymaktivität der Ca^{2+} -NDPase zeigte, ebenso wie die Aktivität der sekretierten *Cimex lectularius*-Apyrasen (Valenzuela J.G. et al., 1998, 2001), eine strikte Calcium-Abhängigkeit (**Abb. 3.5.2.1**). Magnesiumionen führten zu keiner messbaren Enzymaktivität. Bei einer Substratkonzentration von 0,5 mM erreichte die Enzymaktivität ein Maximum bei 1 mM Ca^{2+} . Höhere Konzentrationen von Calciumionen reduzierten die Enzymaktivität. In Abwesenheit zugesetzter divalenter Kationen und nach Zugabe von 1 mM EDTA verblieb eine Restaktivität von 3 % der Maximalaktivität (**Abb. 3.5.2.2**).

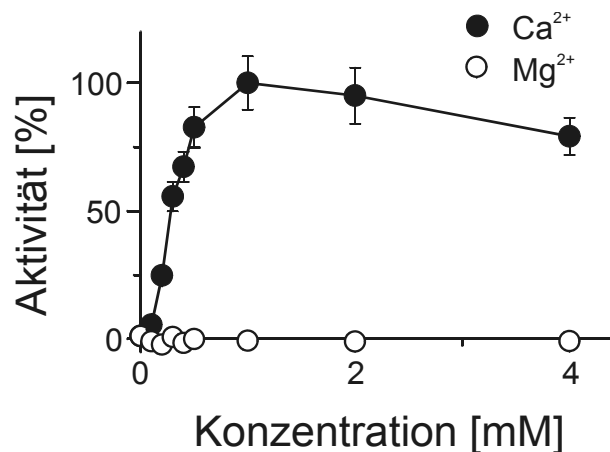


Abbildung 3.5.2.1: Ionenabhängigkeit der Ca^{2+} -NDPase Enzymaktivität. Die Bestimmung der Abhängigkeit der Enzymaktivität von divalenten Kationen zeigte eine strikte Abhängigkeit von Calciumionen. Es wurde 0,5 mM UDP als Substrat verwendet. Die Aktivitätsmessungen erfolgten bei einem pH von 7,0. Die Messwerte wurden Mock-korrigiert und auf 1 mM Ca^{2+} normiert. Der 100 %-Wert entspricht $68 \pm 7 \text{ nmol P}_i / (10^6 \text{ Zellen} \times \text{min})$ ($\pm \text{S.E.}$; $n = 3$).

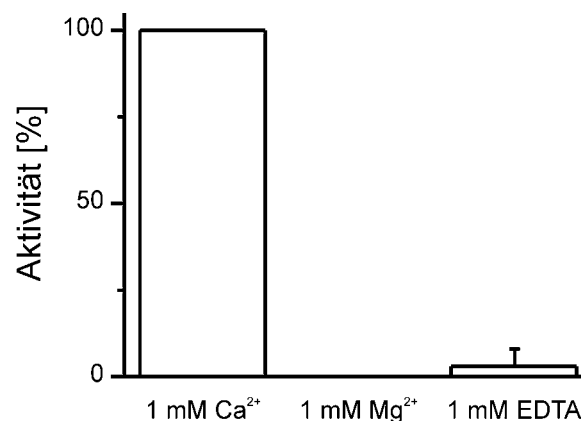


Abbildung 3.5.2.2: Calciumabhängigkeit der Enzymaktivität der Ca²⁺-NDPase. Die Enzymaktivität der Ca²⁺-NDPase zeigte eine strikte Abhängigkeit von Calciumionen. Magnesiumionen zeigten keine Aktivierung. In Abwesenheit zugesetzter divalenter Kationen und nach Zugabe 1 mM EDTA fiel die Aktivität auf 3 % der Maximalaktivität. Es wurden 0,5 mM UDP als Substrat verwendet. Die Aktivitätsmessungen erfolgten bei einem pH von 7,0. Die Messwerte wurden Mock-korrigiert und auf 1 mM Ca²⁺ normiert. Der 100 %-Wert entspricht 68 ± 7 nmol P_i/(10⁶ Zellen x min) (\pm S.E.; $n = 3$).

3.5.3 pH-Optimum der Enzymaktivität

Zur Bestimmung des optimalen pH-Bereiches der Enzymaktivität wurde die UDPase-Aktivität der Ca²⁺-NDPase der Ratte anhand von Membranfraktionen nach heterologer Expression in CHO-Zellen (CERN/pCMV Sport1) bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Hierzu wurde ein kombinierter Hepes-Glycin-Puffer (je 50 mM) zwischen pH 6,0 und 10,5 verwendet. Membranfraktionen Mock-transfizierter CHO-Zellen dienten als Kontrolle. Die Enzymaktivität zeigte ein breites pH-Optimum zwischen pH 6,5 und 7,5 (**Abb 3.5.3**). Die Enzymaktivität fiel bei höheren pH-Werten. Ab einem pH-Wert von 9,5 war keine Aktivität mehr nachweisbar.

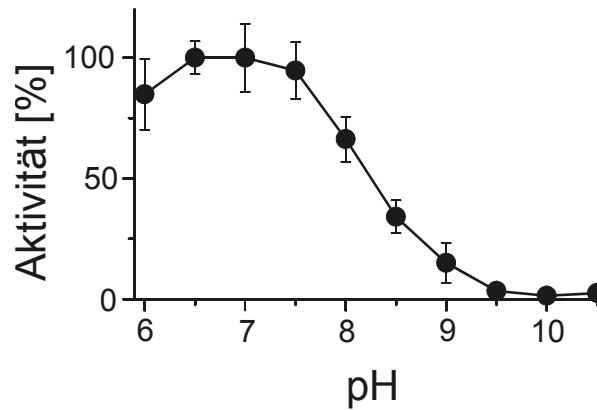


Abbildung 3.5.3: pH-Optimum der Ca^{2+} -NDPase. Die Enzymaktivität der Ca^{2+} -NDPase zeigte ein breites pH-Optimum zwischen pH 6,5 und 7,5. Die Aktivitätsmessungen erfolgten mit 0,5 mM UDP und 1 mM Ca^{2+} . Die Messwerte wurden Mock-korrigiert und auf pH 7,0 normiert. Der 100 %-Wert entspricht $70 \pm 10 \text{ nmol P}_i / (10^6 \text{ Zellen} \times \text{min})$ ($\pm \text{S.E.}$; $n = 3$).

3.5.4 Bestimmung des K_m -Wertes für UDP

Zur Bestimmung des K_m -Wertes für UDP wurden die Enzymaktivitäten der Membranfraktionen nach heterologer Expression der Ca^{2+} -NDPase der Ratte (CERN/pCMV Sport1) bei unterschiedlichen UDP-Konzentrationen bestimmt. Membranfraktionen Mock-transfizierter CHO-Zellen dienten als Kontrolle. Der K_m -Wert für UDP bei einem pH Wert von 7,0 lag bei $216 \pm 14 \mu\text{M}$ ($\pm \text{S.E.}$, $n = 3$) (**Abb. 3.5.4**).

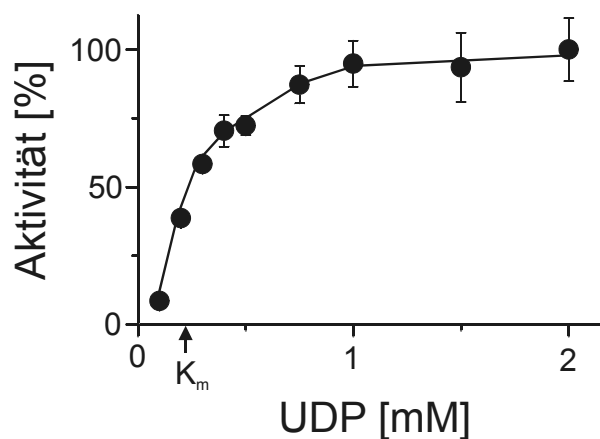


Abbildung 3.5.4: K_m -Wert für UDP. Der K_m -Wert für UDP lag bei $216 \pm 14 \mu\text{M}$ ($\pm \text{S.E.}$, $n = 3$). Die Aktivitätsmessungen erfolgten bei einem pH von 7,0 und einem Substrat/ Ca^{2+} -Verhältnis von 1:2. Die Messwerte wurden Mock-korrigiert und auf 2 mM UDP normiert. Der 100 %-Wert entspricht $90 \pm 10 \text{ nmol P}_i / (10^6 \text{ Zellen} \times \text{min})$ ($\pm \text{S.E.}$; $n = 3$).

3.5.5 Ca^{2+} -NDPase ist ein integrales Membranprotein

Zur Beantwortung der Frage, ob es sich bei beiden Varianten der Ca^{2+} -NDPase der Ratte, d.h. sowohl der vollständigen als auch der 5'-trunkierten Variante, um integrale Membranproteine handelte, wurde die Triton X-114 Separation (Bordier C., 1981) durchgeführt. Das Verfahren beruht auf der Trennung Triton X-114 solubilisierter integraler Membranproteine von löslichen Proteinen oberhalb des Wolkenpunktes (22°C) von Triton X-114. Dabei wurden die Membranproteine, ausgehend von Membranfraktionen transient transfizierter CHO-Zellen (CERN/pCMV Sport1, 3.ATG/pCMV Sport1 und Mock), in eiskalter Lösung mit Triton X-114 solubilisiert. Die Lösung wurde anschließend über den Wolkenpunkt erwärmt, beide Phasen wurden voneinander getrennt und die UDPase-Aktivitäten bestimmt. 35 % der Ausgangsaktivität der vollständigen Ca^{2+} -NDPase, sowie 30 % der Ausgangsaktivität der 5'-trunkierten Ca^{2+} -NDPase, blieben nach der Triton X-114-Behandlung erhalten. Davon fanden sich 99 % der Aktivität der vollständigen, sowie 94 % der Aktivität der 5'-trunkierten, in der integralen Membranproteine enthaltenen Detergensreichen Phase (**Abb. 3.5.5**). Es handelte sich also in beiden Fällen um integrale Membranproteine.

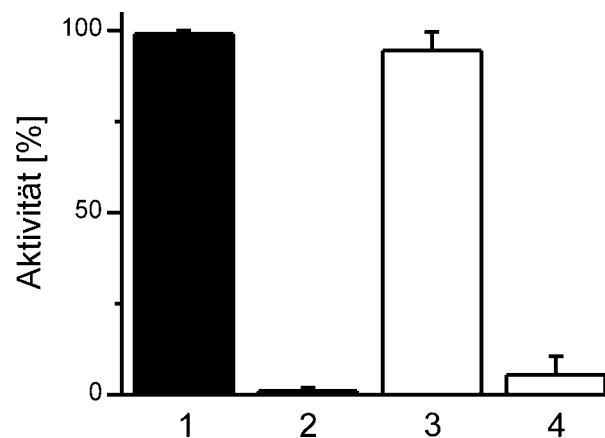


Abbildung 3.5.5: Triton X-114 Auftrennung der beiden Varianten der Ca^{2+} -NDPase. Verteilung der Enzymaktivitäten nach Triton X-114 Separation auf die Detergensreiche und die Detergensarme Phase. Die Aktivitäten der vollständigen Ca^{2+} -NDPase ist in Schwarz, die der 5'-trunkierten in Weiß, dargestellt. Die Aktivitäten wurden mit 0,5 mM UDP, 1 mM Ca^{2+} in Anwesenheit von 0,1 % Triton X-100 bei pH 7,0 bestimmt. Die gemessenen Aktivitäten wurden Mock-korrigiert und die nach der Triton X-114-Behandlung erhaltene Gesamtaktivität beider Phasen auf 100 % gesetzt (Ca^{2+} -NDPase: $22 \pm 2 \text{ nmol P}_i / (10^6 \text{ Zellen} \times \text{min})$; 5'-trunkierte Ca^{2+} -NDPase: $10 \pm 3 \text{ nmol P}_i / (10^6 \text{ Zellen} \times \text{min})$). Spur 1 und 3: Detergensreiche Phasen, Spur 2 und 4: Detergensarme Phasen (Mittelwert \pm Mittelwertabweichung, $n = 2$)

3.5.6 Orientierung des katalytischen Zentrums der Ca^{2+} -NDPase

Zur Untersuchung der Frage, ob sich das katalytische Zentrum der Ca^{2+} -NDPase in einer membranumschlossenen Form oder auf der Zelloberfläche vesikulärer Organellen befindet, wurden Membranfraktionen in einem kombinierten Proteinase K/Triton X-100-Test eingesetzt. Die Membranfraktionen der in CHO-Zellen heterolog exprimierten vollständigen Ca^{2+} -NDPase sowie der Mock-Kontrolle wurden unter isotonischen Bedingungen präpariert. Die Aktivitäten wurden vor und nach der Zugabe von Triton X-100 (0,02 %) sowie nach Zugabe von Proteinase K miteinander verglichen. Die Zugabe von 0,02 % Triton X-100, welches der kritischen Mizellarenkonzentration entspricht, resultierte in einer Steigerung der spezifischen UDPase-Aktivität der Ca^{2+} -NDPase um den Faktor 4,4 (**Abb. 3.5.6, A und B**). Da bei diesen Konzentrationen von Triton X-100 keine Membranproteinsolubilisierung sondern nur ein Aufbrechen von membranumschlossenen Strukturen stattfindet, ließ sich folgern, dass nach der Präparation der Membranfraktionen noch ca. 80 % der Ca^{2+} -NDPase-Aktivität in membranumschlossener Form vorlag. 20 % der Ca^{2+} -NDPase-Aktivität hatte nach der Präparation der Membranfraktionen eine zytosolische Orientierung, vermutlich durch das Aufbrechen organellärer Strukturen während der Präparation (**Abb. 3.5.6, A**). Proteolytische Spaltung der oberflächen Proteine durch Präinkubation mit Proteinase K in Abwesenheit von Triton X-100 und deren anschließende Inhibition mit PMSF vor dem Aktivitätstest, eliminierte die Aktivität des zytosolisch lokalisierten Anteils der Ca^{2+} -NDPase (**Abb. 3.5.6, C**). Die Zugabe von 0,02 % Triton X-100 zu zuvor mit Proteinase K behandelten und mittels PMSF Proteinase K inhibierten Membranfraktionen resultierte in einem enormen Anstieg (Faktor 180) der spezifischen Ca^{2+} -NDPase-Aktivität (**Abb. 3.5.6, C und D**). Die Koapplikation von Proteinase K und Triton X-100 reduzierte die Aktivität nahezu komplett (**Abb. 3.5.6, E**). Anhand dieser Daten ließ sich schlussfolgern, dass die Ca^{2+} -NDPase eine luminalen Orientierung ihres katalytischen Zentrums aufweist. Weiter zeigte sich, dass Mock-transfizierte CHO-Zellen einen endogenen luminalen UDPase-Pool besaßen (**Abb 3.5.6, A und B, C und D**).

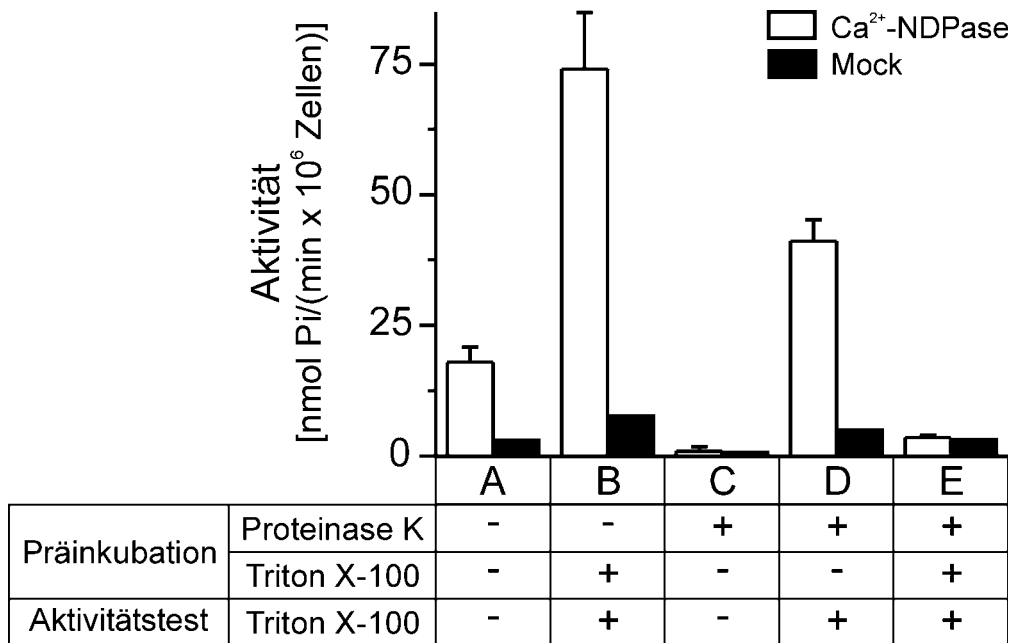


Abbildung 3.5.6: Luminale Orientierung der Ca^{2+} -NDPase. Membranfraktionen der heterolog in CHO-Zellen exprimierten Ca^{2+} -NDPase sowie der Mock-Kontrolle wurden unter isotonischen Bedingungen präpariert. Membranfraktionen wurden präinkubiert in Anwesenheit oder Abwesenheit von Proteinase K (2,5 μg) und Triton X-100 (0,02 %), wie angezeigt. Proteinase K wurde nach der Präinkubation mit PMSF inhibiert. (\pm S.E., $n = 3$).

3.6 Zelluläre Lokalisierung der Ca^{2+} -NDPase nach heterologer Expression in CHO-Zellen

3.6.1 Oberflächenmarkierung der Ca^{2+} -NDPase nach heterologer Expression in CHO-Zellen

Zur Untersuchung einer möglichen Zelloberflächenlokalisierung der Myc-Epitop-markierten vollständigen Ca^{2+} -NDPase, sowie der Myc-Epitop-markierten 5'-trunkierten Variante, wurden beide heterolog in CHO-Zellen exprimiert. Als Kontrolle dienten Mock-transfizierte CHO-Zellen. Der anti-Myc Antikörper wurde zwei Tage nach der Transfektion auf die lebenden Zellen appliziert. Nach Methanolfixierung und Applikation des Cy3-gekoppelten anti-Maus-Zweitantikörpers konnte für keines der beiden Enzyme eine Oberflächenexpression nachgewiesen werden (**Abb. 3.6.1**).

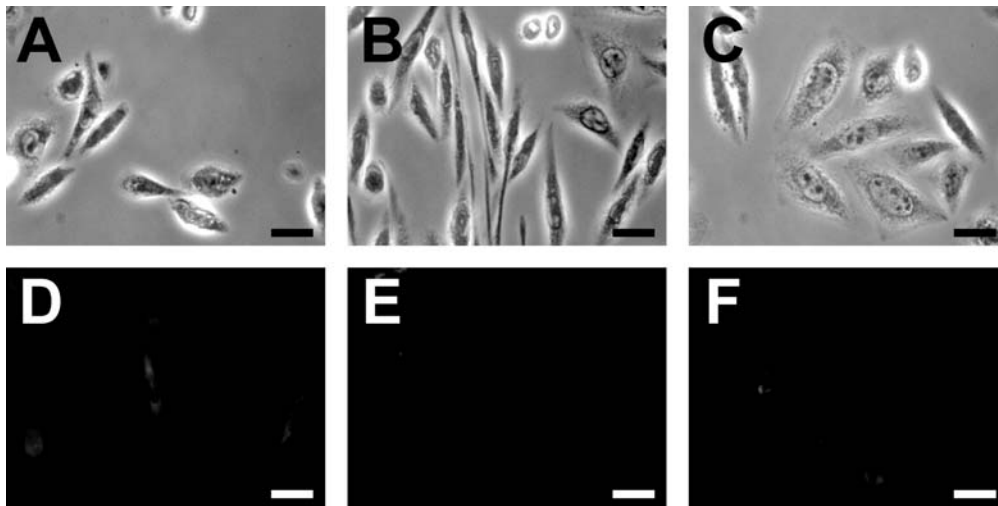


Abbildung 3.6.1: Oberflächenmarkierung nach heterologer Expression in CHO-Zellen. Die lebenden Zellen wurden zwei Tage nach der Elektroporation mit dem anti-Myc Antikörper markiert. Nach Methanolfixierung wurde der Cy3-konjugierte Zweitantikörper appliziert. **A,D:** Mock-Kontrolle; **B,E:** vollständige Ca^{2+} -NDPase-Myc His; **C,F:** 5'-trunkierte Ca^{2+} -NDPase-Myc His; **A,B,C:** Phasenkontrast; **D,E,F:** Immunfluoreszenz. Die Balken entsprechen 20 μm .

3.6.2 Intrazelluläre Lokalisierung der Ca^{2+} -NDPase nach heterologer Expression in CHO-Zellen

Zur Identifizierung der intrazellulären Lokalisierung der Ca^{2+} -NDPase wurden immunzytochemische Markierungen nach heterologer Expression des Myc-Epitop tragenden Proteins in CHO-Zellen durchgeführt. Immunzytochemische Markierungen mit dem monoklonalen anti-Myc-Antikörper zeigten zwei Tage nach der Transfektion der CHO-Zellen eine retikuläre Verteilung der Ca^{2+} -NDPase (**Abb. 3.6.2.1, C**). Doppelmarkierungen der Myc-Epitop-markierten Ca^{2+} -NDPase und von Calnexin, einem Chaperon des endoplasmatischen Retikulums (Yamashita K. et al., 1999), ergaben einen sehr hohen Grad an Kollokalisierung der beiden Proteine (**Abb. 3.6.2.1, C – F**). Dies ließ vermuten, dass die Ca^{2+} -NDPase im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Doppelmarkierung der Myc-Epitop-markierten Ca^{2+} -NDPase sowie mit dem AlexaFluor-488®-konjugierten Lektin WGA, welches eine starke Markierung des medialen und trans Golgi-Apparates zeigt (Parkkinen J.J. et al., 1997), verwies auf eine unterschiedliche zelluläre Verteilung der Ca^{2+} -NDPase im Vergleich zum Golgi-Apparat (**Abb. 3.6.2.1, I und J**). Jedoch konnten anhand von CLSM-Aufnahmen, Ca^{2+} -NDPase-immunoreaktive organelläre Strukturen in der

Nähe einzelner Golgi-Stapel identifiziert werden (Abb. 3.6.2.1, K und L). Bei diesen Prä-Golgistrukturen handelte es sich vermutlich um das zwischen ER und Golgi lokalisierte Kompartiment ERGIC (Kappeler F. et al., 1997). Die 5'-trunkierte Variante zeigte die gleiche zelluläre Lokalisierung (Abb. 3.6.2.2).

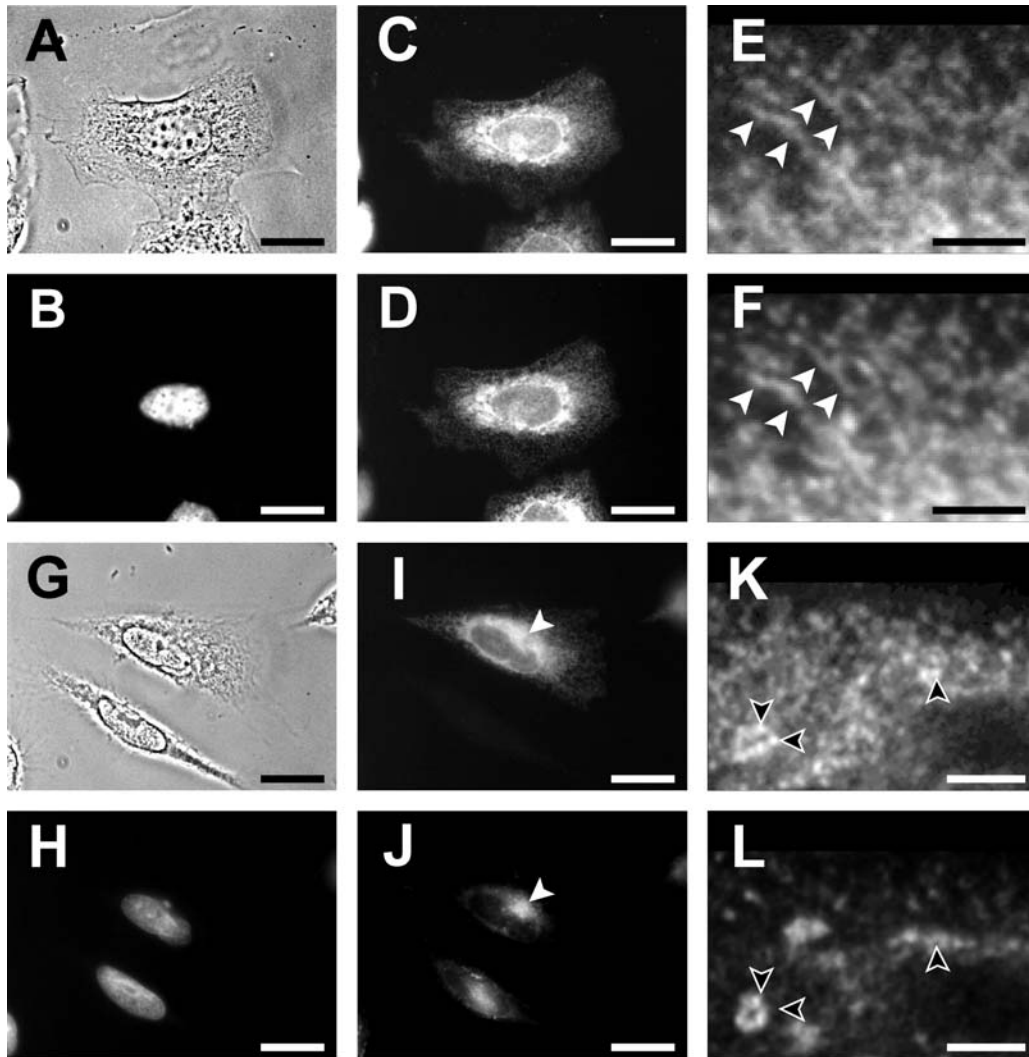


Abbildung 3.6.2.1: Intrazelluläre Markierung der Myc-Epitop-markierten Ca^{2+} -NDPase nach heterologer Expression in CHO-Zellen. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Elektroporation mit Methanol fixiert und markiert. C,E, I, K: Ca^{2+} -NDPase-Myc His; D,F: Calnexin; K, L: Markierung mit AlexaFluor-488® WGA; A, G: Phasenkontrast; B, H: Markierung der Zellkerne mit DAPI; Die Balken entsprechen 16 μm in A – D G – H, sowie 3 μm in E,F, K und L.

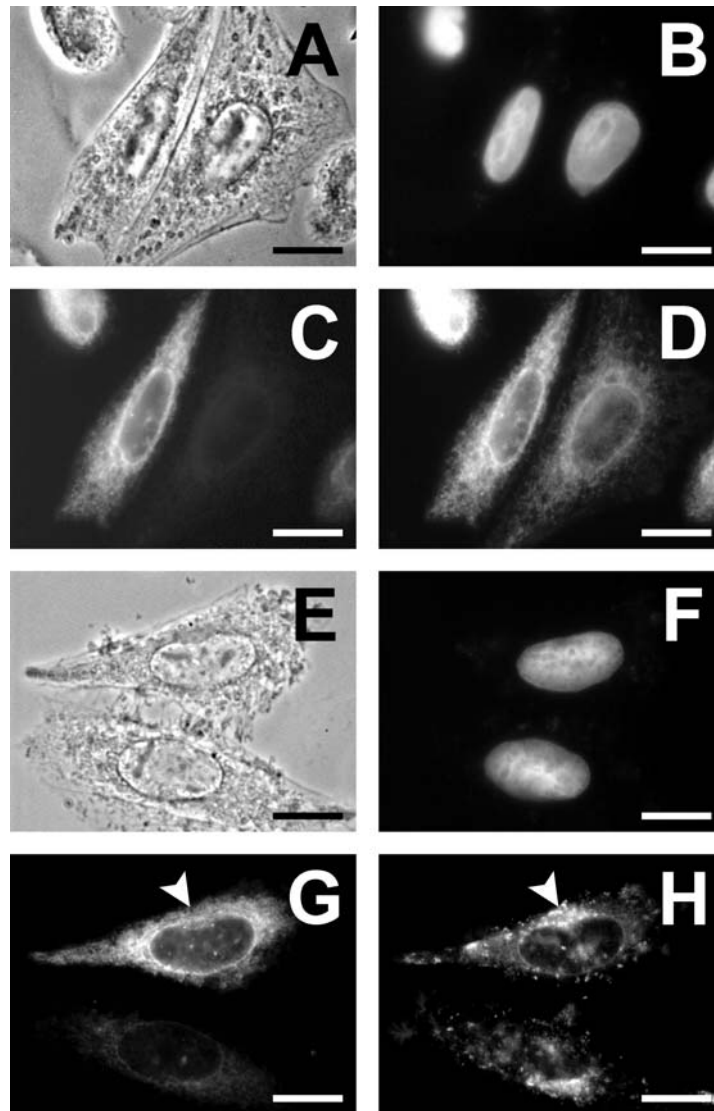


Abbildung 3.6.2.2: Intrazelluläre Markierung der Myc-Epitop-markierten 5'-trunkierten Ca^{2+} -NDPase nach heterologer Expression in CHO-Zellen. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Elektroporation mit Methanol fixiert und markiert. **C, G:** 5'-trunkierte Ca^{2+} -NDPase-Myc His; **D:** Calnexin; **H:** Markierung mit AlexaFluor-488[®] WGA; **A, E:** Phasenkontrast; **B, F:** Markierung der Zellkerne mit DAPI; Die Balken entsprechen 10 μm .

3.7 Charakterisierung der Quartärstrukturen von NTPDase1 und NTPDase2 der Ratte nach heterologer Expression in Oocyten von *Xenopus laevis*

3.7.1 Funktionelle heterologe Expression der NTPDase1 und NTPDase2 in Oocyten von *Xenopus laevis*

Zur Überprüfung, ob sich das Oocyten-System zur Expression der NTPDase1 und NTPDase2 der Ratte eignet, wurde die cRNA der N-terminal das Hexahistidyl-Epitop tragenden Proteine in Oocyten injiziert. Anschließend erfolgte die metabolische Markierung der Proteine mit ^{35}S -Methionin. Drei Tage nach der Injektion der cRNA wurden die Membranproteine mit wasserlöslichem Digitonin solubilisiert und über Ni^{2+} -NTA-Agarose gereinigt. Die gereinigten Proteine wurden mit EndoH oder PNGase F deglycosyliert. Da EndoH, im Gegensatz zur PNGase F, nur Hochmannose- und Hybridoligosaccharide jedoch nicht komplexe Oligosaccharide von Proteinen abspalten kann, deutet eine Endo H-Sensitivität von Plasmamembranproteinen auf Probleme bei der Proteinsynthese und Assemblierung hin, wodurch das entsprechende Protein im ER zurückgehalten wird. Es zeigte sich, dass nach drei Tagen nur ein kleiner Teil der exprimierten NTPDase1 und NTPDase2 Endo H sensitiv waren (**Abb. 3.7.1.1, Spur 2 und 5**) und sich somit noch im ER befand. Der weitaus größte Teil der Proteine wurde von Endo H nicht deglycosyliert. PNGase F führte hingegen zur kompletten Deglycosylierung beider Proteine (**Abb. 3.7.1.1, Spur 3 und 6**).

Da sich keine Hinweise auf Probleme bei der Proteinsynthese in *Xenopus laevis*-Oocyten fanden, wurden einen Tag nach der cRNA Injektion die Oberflächenaktivitäten der beiden Enzyme bezüglich der Substrate ATP und ADP gemessen (**Abb. 3.7.1.2**). Nicht injizierte Oocyten dienten als Kontrolle. Die Substratspezifitäten entsprachen in etwa den Werten der heterolog in CHO-Zellen exprimierten Enzyme (Heine P. et al., 1999). Für die NTPDase1 fand sich ein ATP:ADP-Verhältnis von 1 : 1,1 und für die NTPDase2 von 1 : 0,1.

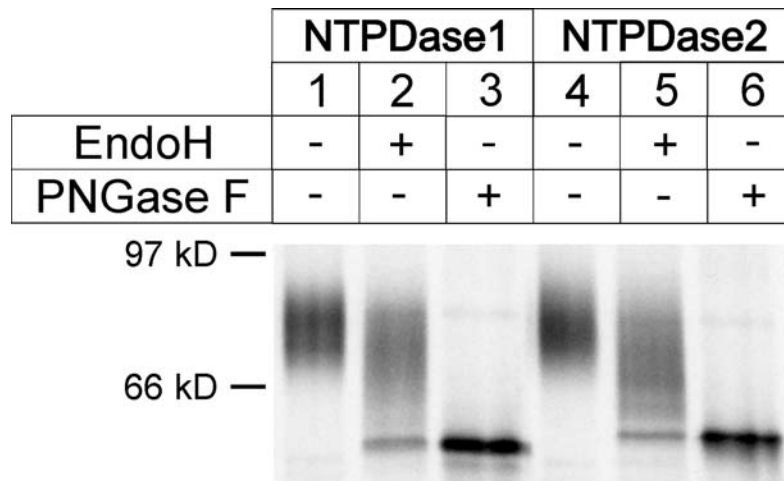


Abbildung 3.7.1.1: Deglycosylierung der NTPDase1 und NTPDase2 nach heterologer Expression in *Xenopus laevis*-Oocyten. Aliquots über Ni^{2+} -NTA-Agarose gereinigter NTPDase1 und NTPDase2 wurden entweder mit EndoH oder PNGase F deglycosyliert und über eine 4 – 10 % SDS-PAGE analysiert.

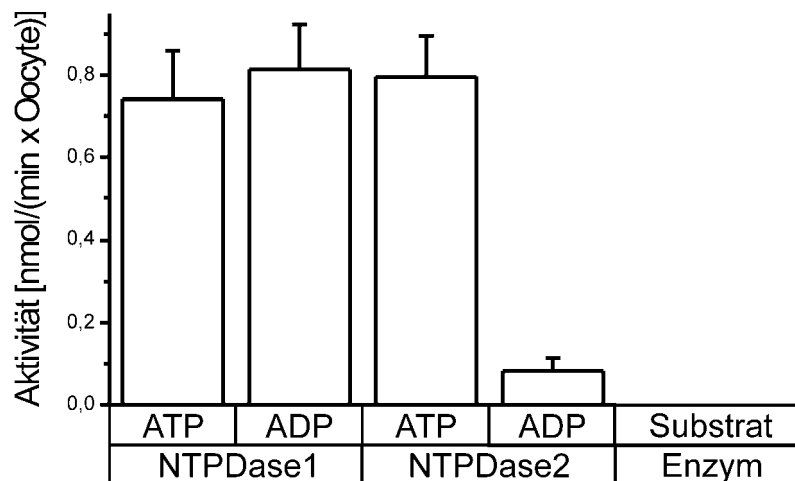


Abbildung 3.7.1.2: Zelloberflächenaktivitäten von NTPDase1 und NTPDase2 nach heterologer Expression in *Xenopus laevis*-Oocyten. Einen Tag nach der cRNA-Injektion wurden die Oberflächenaktivitäten bei einer Substratkonzentration von 2 mM bestimmt. Die Aktivitäten der Kontrollen wurden subtrahiert. (\pm S.E.; $n = 6$ für NTPDase1 und $n = 7$ für NTPDase2)

3.7.2 Untersuchung der Quartärstrukturen von NTPDase1 und NTPDase2 nach heterologer Expression in *Xenopus laevis*-Oocyten mittels SDS-PAGE

Zur Untersuchung der Quartärstrukturen der NTPDase1 und der NTPDase2 wurden die N-terminal das Hexahistidyl-Epitop tragenden Proteine heterolog in *Xenopus laevis* Oocyten exprimiert. Die Proteine wurden metabolisch mit ^{35}S -Methionin markiert und nach Solubilisierung mit Digitonin über Ni^{2+} -NTA-Agarose gereinigt. Digitonin ist ein ungeladenes mildes Detergens, welches Membranproteinkomplexe nativ solubilisieren kann. So konnten nach Digitoninsolubilisierung sowohl die NTPDase1 (Wang T.F., Ou Y. und Guidotti G., 1998) als auch der P2X-Rezeptor (Nicke A. et al., 1998) nativ isoliert werden.

Die über Ni^{2+} -NTA-Agarose gereinigten Proteine wurden mittels Glutardialdehyd kovalent vernetzt und zusammen mit nicht vernetzten Aliquots der Proteine auf einem 4 – 10 % linearen SDS-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen analysiert (**Abb. 3.7.2**). Die dominierende Quartärstruktur der NTPDase1 ist ein Dimer bei 132 kD. Neben dem Dimer zeigten sich noch ein sehr schwaches Trimer bei 200 kD und eine stärkere Monomerbande bei 67 kD. Für die NTPDase2 ergab sich ein stärkeres Dimer bei 145 kD. Daneben zeigten sich noch deutliche Banden eines Trimers (214 kD) und eines Tetramers (286 kD). Das Monomer (72 kD) war kaum vorhanden. Die Quartärstrukturen beider Enzyme wurden nicht durch intermolekulare S-S-Brücken gebildet, wie anhand der nicht reduzierenden SDS-PAGE gezeigt werden konnte (**Abb. 3.7.2, Spur 1 und 3**). Auch unter nicht reduzierenden Bedingungen wurden nur Monomere nachgewiesen.

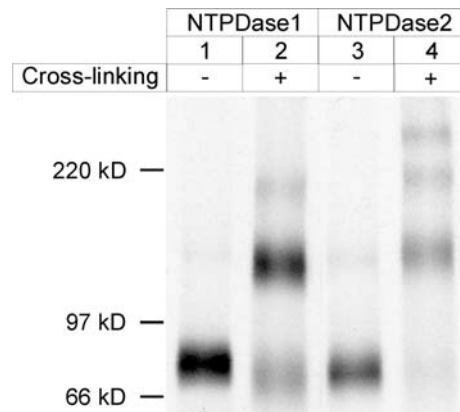


Abbildung 3.7.2: Quartärstrukturen der NTPDase1 und der NTPDase2 nach Glutardialdehyd-Cross-Linking und nicht reduzierender SDS-PAGE. Die Hexahistidyl-Epitop markierten Proteine wurden drei Tage nach der Injektion der cRNA mit Digitonin solubilisiert und über Ni^{2+} -NTA-Agarose gereinigt. Aliquots der gereinigten Proteine wurden mit Glutardialdehyd vernetzt. Vernetzte und unbehandelte Proben wurden mittels nicht reduzierender SDS-PAGE analysiert.

3.7.3 Untersuchung der Quartärstrukturen der NTPDase1 und der NTPDase2 nach heterologe Expression in *Xenopus laevis*-Oocyten mittels BN-PAGE

Zur Analyse nativer multimerer Komplexe nach heterologer Expression in *Xenopus laevis*-Oocyten nach radioaktiver Markierung und Reinigung der Digitonin-solubilisierten Proteine über Ni^{2+} -NTA-Agarose diente die von Schagger (Schagger H., 2001, 1996, 1995, 1994b, 1994a, 1991) entwickelte Blau Native-Gelelektrophorese (BN-PAGE). Das Verfahren beruht auf einer Ladungsverschiebung der Proteine durch Anlagerung des negativ geladenen Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an positiv geladene sowie hydrophobe Bereiche. Durch die Anlagerung an hydrophoben Bereichen dient der Farbstoff als Detergensersatz während der Elektrophorese von Membranproteinen.

NTPDase1 und NTPDase2 zeigten in der BN-PAGE (**Abb. 3.7.3, A, Spur 1; B, Spur 1**) die gleichen Quartärstrukturen wie nach Glutardialdehyd-Cross-Linking in der nicht reduzierenden SDS-PAGE. Dies verdeutlicht, dass die BN-PAGE eine adäquate Methode zur Untersuchung von Quartärstrukturen nativer Proteinkomplexe ist.

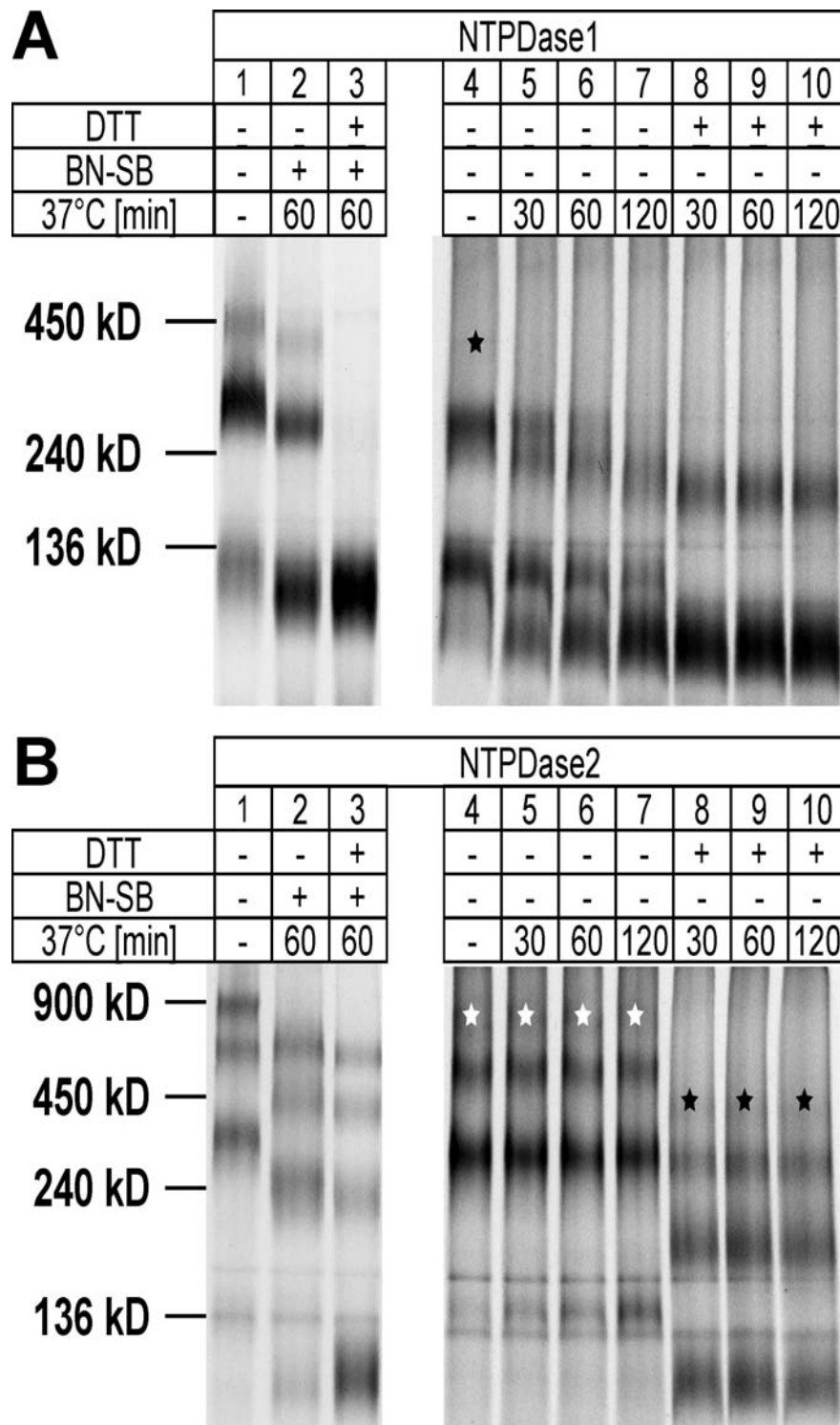


Abbildung 3.7.3: Analyse der Quatärstrukturen der NTPDase1 (A) und der NTPDase2 (B) mittels BN-PAGE. Die Hexahistidyl-Epitop-markierten Proteine wurden mit Digitonin solubilisiert und über Ni^{2+} -NTA-Agarose gereinigt. Aliquots der gereinigten Proteine wurden vor der Analyse mit DTT (100 mM), BN-Probenpuffer oder ohne Zusätze bei 37°C inkubiert. Behandelte und unbehandelte Proben wurden mittels BN-PAGE analysiert. Die Proteine der Spuren 1 – 3 in A und B wurden für 6 Tage in Oocyten exprimiert, alle anderen für 3 Tage. Schwache Banden wurden durch Sternchen markiert.

Zur Untersuchung der Homomultimerstabilität von NTPDase1 und NTPDase2 wurden Aliquots der gereinigten Proteine unter verschiedenen Bedingungen vorbehandelt, bevor sie mittels BN-PAGE analysiert wurden. Inkubation von NTPDase1 bei 37°C ergab mit zunehmender Dauer eine steigende, jedoch auch nach zwei Stunden nicht vollständige, Dissoziation der Multimere (**Abb. 3.7.3, A, Spur 4 – 7**). Interessanterweise bildeten sich bei der Inkubation Doppelbanden, was auf eine Konformationsänderung und daraus resultierende höhere Mobilität in der BN-PAGE hindeutete. Die Inkubation der NTPDase1 bei 37°C in Gegenwart von 100 mM DTT führte ebenfalls nicht zur vollständigen Dissoziation der Multimere (**Abb. 3.7.3, A, Spur 4, 8 – 10**). Nach DTT-Behandlung laufen die Banden der NTPDase1 auf der gleichen Höhe wie die entstehenden Doppelbanden bei der Inkubation bei 37°C ohne weitere Zusätze. Dies deutete zusätzlich auf eine Konformationsänderung der Struktur der NTPDase1 hin. Erst eine Inkubation bei 37°C in Gegenwart von 100 mM DTT und des BN-Probenpuffers vermochte eine vollständige Dissoziation der NTPDase1-Multimere zu bewirken (**Abb. 3.7.3, A, Spur 1 – 3**). Zur vollständigen Dissoziation der Multimerstruktur der NTPDase1 wurde somit das Reduktionsmittel DTT und die unter diesen Bedingungen denaturierende Wirkung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 benötigt.

Im Gegensatz zur NTPDase1 waren die NTPDase2-Multimerstrukturen bei einer Inkubation bei 37°C extrem stabil und der Monomeranteil nahm kaum zu (**Abb. 3.7.3, B, Spur 5 – 7**). Selbst Inkubationen in Gegenwart von 100 mM DTT mit oder ohne BN-Probenpuffer führten, im Gegensatz zur NTPDase1, nicht zu einer vollständigen Dissoziation der Multimerstrukturen (**Abb. 3.7.3, B, Spur 1 – 3 und 4, 8 – 10**). Jedoch zeigte die NTPDase2 unter diesen Bedingungen ebenfalls eine erhöhte Mobilität in der BN-PAGE.

3.7.4 Änderung der NTPDase2 Substratspezifität mit zunehmender Dauer der heterologen Expression in *Xenopus laevis* Oocyten

Die Substratspezifität der NTPDase2 änderte sich mit zunehmender Dauer der heterologen Expression. Die relative ADPase-Aktivität der NTPDase2 stieg nach sieben Tagen signifikant ($p < 0,0001$) um das vierfache im Vergleich zum ersten Tag der Expression (**Tab. 3.7.4**). Dies führte von einem ATP:ADP-Verhältnis von 1 : 0,1 nach 24 h Expression zu einem Verhältnis von 1 : 0,4 nach sieben Tagen (**Abb. 3.7.4.1**). Im Gegensatz zur NTPDase2 zeigte die NTPDase1 keine Änderung ihrer Substratpräferenz.

Enzym	Expression [d]	n	ATPase-Aktivität [nmol/(min x Oocyte)]	ATPase-Aktivität [nmol/(min x Oocyte)]	ATP : ADP
NTPDase1	1	6	0,743 ± 0,117	0,814 ± 0,109	1 : 1,1
	7	6	0,897 ± 0,160	0,925 ± 0,170	1 : 1,0
NTPDase2	1	7	0,798 ± 0,097	0,083 ± 0,029	1 : 0,1
	7	6	1,111 ± 0,409	0,441 ± 0,115	1 : 0,4

Tabelle 3.7.4: Zeitliche Änderung der Substratspezifität der NTPDase2. Die Oberflächenaktivitäten von NTPDase1 und NTPDase2 wurden in Gegenwart von 2 mM Substrat gemessen. (± S.E.)

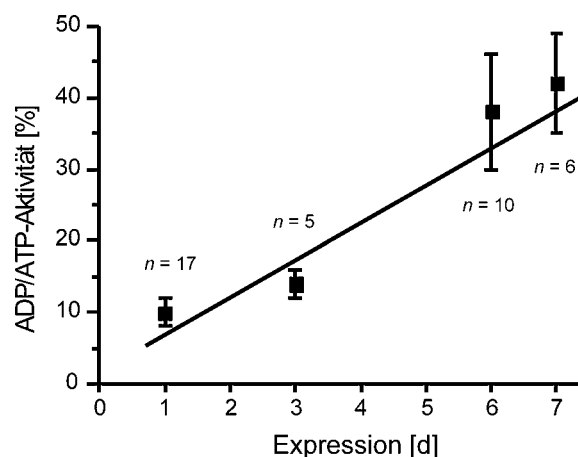


Abbildung 3.7.4.1: Zeitliche Änderung der relativen ADPase-Aktivität der NTPDase2. Die Oberflächenaktivitäten der NTPDase2 wurden in Gegenwart von 2 mM Substrat gemessen. Als Kontrolle dienten nicht injizierte Oocyten. (± S.E.)

Um zu untersuchen, ob die zeitliche Änderung der NTPDase2 Substratspezifität mit einer Änderung der Multimerstruktur einhergeht, wurden NTPDase2 und zur Kontrolle auch NTPDase1 sowohl metabolisch als auch an der Zelloberfläche radioaktiv markiert. Zur radioaktiven Markierung der Oberflächenproteine intakter Oocyten wurden diese mittels ^{125}I markiertem Sulfo-SHPP (Thompson J.A. et al., 1987) inkubiert. Die über Ni^{2+} -NTA-Agarose gereinigten Proteine wurden anschließend mittels BN-PAGE analysiert.

Die Änderung der Substratspezifität der NTPDase2 ging mit einer Änderung des multimeren Verteilungsmusters der NTPDase2 einher. Mit zunehmender Expressionsdauer nahm der relative Anteil höherer Multimerer zu (**Abb. 3.7.4.2, B**). Dies war sowohl in den metabolisch markierten (Gesamtpool) als auch den mittels radioaktivem Iod an der Zelloberfläche markierten Proben zu erkennen. In den Oberflächen-markierten Proben sind die Multimeranteile im Vergleich zur metabolischen Markierung etwas zu den niedrigeren Werten verschoben. Der Grund hierfür könnte in der Bindung des relativ großen ^{125}I -Sulfo-SHPP an in räumlicher Nähe liegender Lysinreste und der damit einhergehenden sterischen Hinderung liegen. Im Gegensatz zur NTPDase2 zeigte die NTPDase1 keine signifikante Änderung ihrer Multimerstruktur in Abhängigkeit von der Expressionsdauer (**Abb. 3.7.4.2, A**), einhergehend mit der Tatsache das auch keine funktionelle Änderung eintrat.

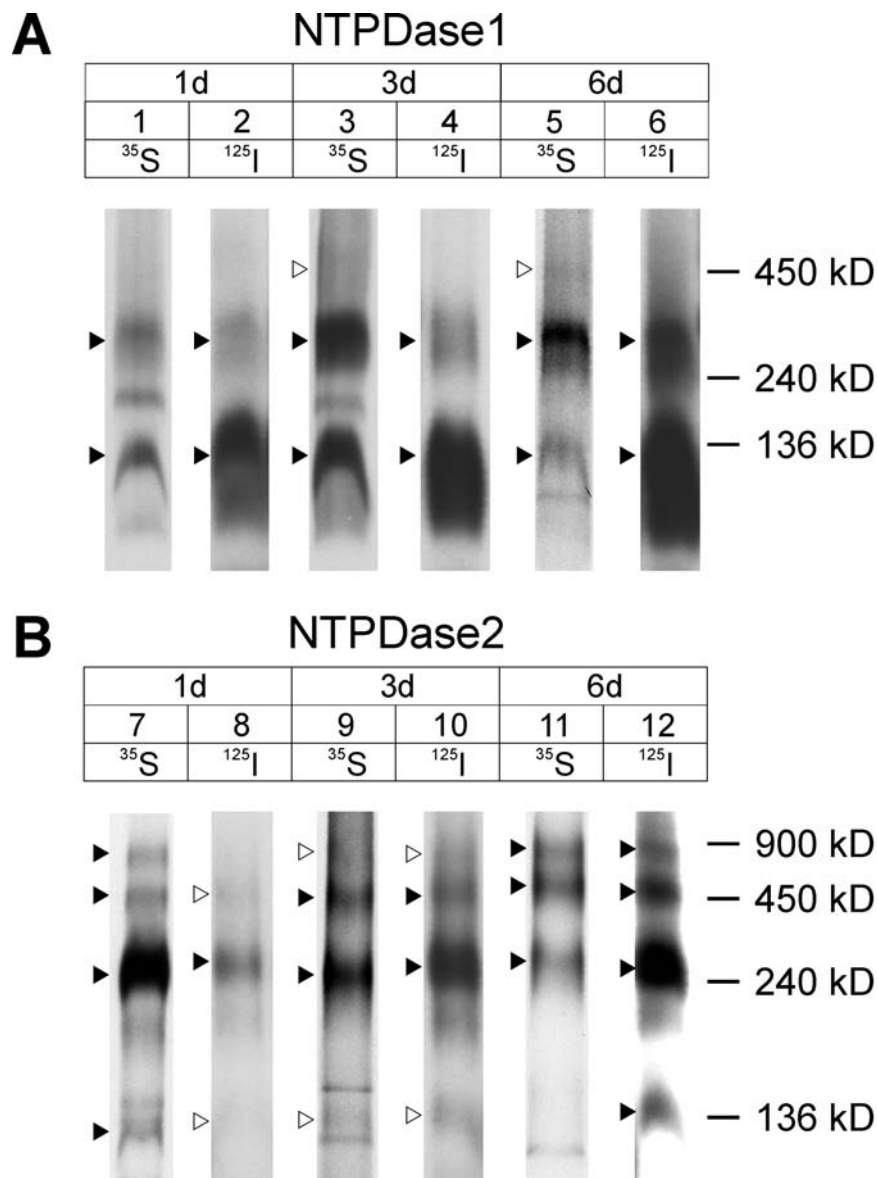


Abbildung 3.7.4.2: Analyse der Quatärstrukturen der NTPDase1 (A) und der NTPDase2 (B) nach metabolischer Markierung und Markierung der Zelloberfläche zu unterschiedlichen Expressionszeitpunkten mittels BN-PAGE. Die Proteine wurden entweder metabolisch mit ³⁵S-Methionin oder an der Zelloberfläche mit ¹²⁵Iod-Sulfo-SHPP markiert. Die Hexahistidyl-Epitop markierten Proteine wurden mit Digitonin solubilisiert und über Ni²⁺-NTA-Agarose gereinigt. Aliquots der gereinigten Proteine wurden mittels BN-PAGE. Die Proteinbanden der NTPDase1 und NTPDase2 wurden durch Pfeilspitzen markiert. Schwache Banden wurden mit einer weißen Pfeilspitze markiert.

3.7.5 NTPDase1/NTPDase2 Heteromultimere nach heterologer Expression in *Xenopus laevis*-Oocyten

Um die mögliche Ausbildung von NTPDase1/NTPDase2-Heteromultimeren zu untersuchen, wurden Kopräzipitationversuche durchgeführt. Hierzu wurde die mittels eines Hexahistidyl-Epitops markierte NTPDase1 mit der Wildtyp-Form der NTPDase2 in *Xenopus laevis*-Oocyten koexprimiert. Die Membranproteine wurden mit Digitonin solubilisiert. Anschließend wurde versucht die wt-NTPDase2 über Hexahistidyl-Epitop-markierte native NTPDase1-Proteinkomplexe mittels Ni^{2+} -NTA-Chromatographie zu kopräzipitieren. Die Proben wurden mittels Slot- sowie Western-Blot und spezifischer polyklonaler Antikörper gegen NTPDase1 (C9 2B2) und NTPDase2 (BZ3B3) analysiert. Als Kontrollen dienten die Expressionen der His₆-NTPDase1, His₆-NTPDase2, wt-NTPDase2 und nicht injizierte Oocyten.

Wie man anhand des Slot-Blots (**Abb. 3.7.5.1**) erkennen kann, war es möglich, die wt-NTPDase2 (**Abb. 3.7.5.1, A5-6**) mit der His₆-NTPDase1 (**Abb. 3.7.5.1, B5-6**) zu präzipitieren. Das immunreaktive Signal der koexprimierten His₆-NTPDase1 (**Abb. 3.7.5.1, B5-6**) entsprach in etwa dem der alleinigen Expression der His₆-NTPDase1 (**Abb. 3.7.5.1, B2**). Das immunreaktive Signal der koisolierten wt-NTPDase2 (**Abb. 3.7.5.1, A5-6**) war deutlich schwächer als jenes der koexprimierten His₆-NTPDase1 (**Abb. 3.7.5.1, B5-6**). Desweiteren war es auch von deutlich geringerer Intensität als jenes der allein exprimierten und über Ni^{2+} -NTA-Chromatographie gereinigten His₆-NTPDase2 (**Abb. 3.5.7.1, A3**). Der sehr geringe Anteil an wt-NTPDase2 im Kopräzipitat spricht gegen eine signifikante Tendenz zur Heteromultimerbildung.

Die Aussage der Slot-Blot-Analysen wurden durch Western-Blots (**Abb. 3.7.5.2**) bekräftigt. Auch hier konnte nur ein, im Vergleich zur allein exprimierten His₆-NTPDase2 (**Abb. 3.7.5.2, B3**), deutlich schwächeres immunreaktives Signal der wt-NTPDase2 im Kopräzipitat nachgewiesen werden (**Abb. 3.7.5.2, B5**). Das immunreaktive Signal der koexprimierten His₆-NTPDase1 (**Abb. 3.7.5.2, A5**) war in der Größenordnung der allein exprimierten His₆-NTPDase1 (**Abb. 3.7.5.2, A2**). Ein signifikantes immunreaktives Signal konnte auch nach heterologer Expression und Ni^{2+} -NTA-Chromatographie der wt-NTPDase2 nachgewiesen werden (**Abb. 3.7.5.2,**

B4). Dies spricht dafür, dass der sehr geringe Anteil der wt-NTPDase2 im Kopräzipitat die Folge unspezifischer Bindungen ist und nicht von einem spezifischen NTPDase1/NTPDase2-Multimer herrührt.

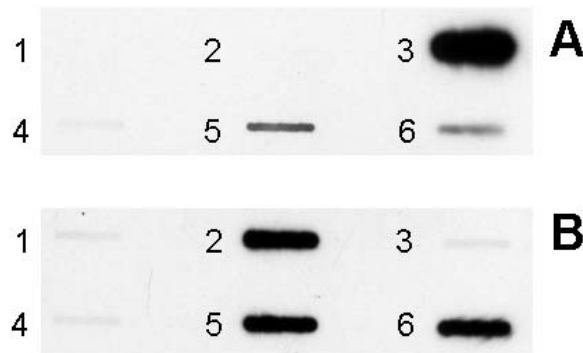


Abbildung 3.7.5.1: Untersuchung der Tendenz zur Heteromultimerbildung aus NTPDase1 (B) und NTPDase2 (A) mittels Slot-Blot. Nach heterologer Expression in *Xenopus laevis*-Oocyten wurden die Digitonin-solubilisierten und mittels Ni^{2+} -NTA-Chromatographie gereinigten Proteine mittels Slot-Blot und anschließender Immundetektion analysiert. **1:** nicht-injizierte Oocyten; **2:** His₆-NTPDase1; **3:** His₆-NTPDase2; **4:** wt-NTPDase2; **5:** His₆-NTPDase1/wt-NTPDase2, cRNA-Verhältnis 1:1; **6:** His₆-NTPDase1/wt-NTPDase2, cRNA-Verhältnis 1:2; **A:** 1. Antikörper gegen die Ratten-NTPDase2 (BZ3B3); **B:** 1. Antikörper gegen die Ratten-NTPDase1 (C9 2B2).

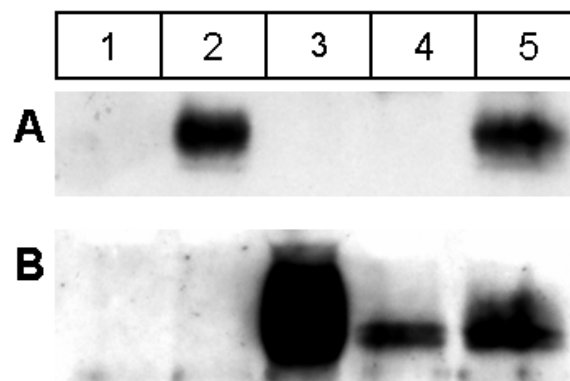


Abbildung 3.7.5.2: Untersuchung der Tendenz zur Heteromultimerbildung von NTPDase1 und NTPDase2 mittels Western-Blot. Nach heterologer Expression in *Xenopus laevis*-Oocyten wurden die Digitonin-solubilisierten und mittels Ni^{2+} -NTA-Chromatographie gereinigten Proteine mittels Slot-Blot und anschließender Immundetektion analysiert. **1:** nicht-injizierte Oocyten; **2:** His₆-NTPDase1; **3:** His₆-NTPDase2; **4:** wt-NTPDase2; **5:** His₆-NTPDase1/wt-NTPDase2, cRNA-Verhältnis 1:1; **A:** 1. Antikörper gegen die Ratten-NTPDase1 (C9 2B2); **B:** 1. Antikörper gegen die Ratten-NTPDase2 (BZ3B3).

4. Diskussion

4.1 Klonierung, Expression und funktionelle Charakterisierung einer neuen Ca^{2+} -abhängigen NDPase des endoplasmatischen Retikulums

In der vorliegenden Arbeit konnte ausgehend von den löslichen sekretierten Apyrasen blutsaugender Insekten (Valenzuela J.G. et al., 2001, 1998); Charlab R. et al., 1999) eine neue Ca^{2+} -abhängige NDPase (EC 3.6.1.6) kloniert und funktionell charakterisiert werden. Ihre mRNA wurde in allen untersuchten Geweben der Ratte, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung, nachgewiesen. Im Gegensatz zu den homologen Insektenapyrasen hydrolysierte das homologe Säugerenzym UDP, GDP und IDP, während ATP und ADP keine Substrate waren. Die Enzymaktivität der Ca^{2+} -NDPase ist, ebenso wie die der homologen Insektenapyrasen, strikt von Calciumionen abhängig. Das Enzym zeigte ein breites pH-Optimum zwischen 6,5 und 7,5 und einen K_m -Wert für UDP von 216 μM . Die Ca^{2+} -NDPase ist ein Transmembranprotein, dessen katalytische Domäne im Lumen des ER lokalisiert ist.

Anhand eines Dendrograms homologer Sequenzen wird gezeigt, dass sich diese Enzyme in zwei Gruppen unterteilen lassen. Die Sequenzen der Ca^{2+} -NDPase-Familie weisen untereinander eine sehr hohe Homologie auf. So liegt die Homologie zwischen der Ca^{2+} -NDPase der Ratte und der humanen Sequenz bei 86 %. Sogar zum Protein des Krallenfrosches *Silurana Tropicalis* zeigt das Enzym der Ratte 71 % Identität. Die *Cimex lectularius*-Apyrase-Familie wird von den Insektensequenzen gebildet. Die Sequenzen dieser Familie zeigen einen deutlich geringen Grad der Homologie sowohl zur Ca^{2+} -NDPase-Familie als auch untereinander. Die Homologie zwischen den löslichen sekretierten Apyrasen der Bettwanze *Cimex lectularius* und der Sandfliege *Phlebotomus papatasi* liegt bei nur 36 %. In der gleichen Größenordnung liegt die Homologie zwischen der löslichen sekretierten Apyrase der Bettwanze und der Ca^{2+} -NDPase der Ratte (37 %). Daher lässt sich vermuten, dass sich die evolutionäre Entwicklung beider Familien schon relativ früh trennte.

4.1.1 Funktionelle Expression der Ca^{2+} -NDPase

Der offene Leserahmen der Ca^{2+} -NDPase der Ratte kodiert für 403 Aminosäurereste. Die Ca^{2+} -NDPase besitzt zwei N-terminale hydrophobe Bereiche sowie drei mögliche Startcodons innerhalb des Leserasters. Zwischen den beiden hydrophoben Bereichen und nach dem dritten möglichen Startcodon fand sich ein mögliches RXR-ER-Retentions/Rücktransport-Motiv (Bichet D. et al., 2002; Scott D.B. et al., 2001; Margeta-Mitrovic M. et al., 2000; Xia H. et al., 2001; Zerangue N. et al., 1999). Keines der drei möglichen Startcodons stand im Kontext einer Kozak-Sequenz (GCC[A/G]CC**ATGG**) zur optimalen Translationsinitiation (Kozak M., 1999, 1996, 1981). Dabei sind nach diesem Modell ein Purin (A oder G) in Position -3 sowie ein G in Position +4 entscheidend für eine optimale Translation. Jedoch zeigte eine Untersuchung von 1534 mRNA Sequenzen, dass 54 % der Transkripte in diesen Positionen und sogar 5 % der Transkripte in allen Positionen von der Kozak-Sequenz abwichen (Peri S. et al., 2001). In diesen Fällen scheint die Translationskontrolle stärker von regulativen Elementen der 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche abhängig zu sein (Pesole G. et al., 2001). Die Stabilität der mRNA kann einen Mechanismus zur Regulation der Translation darstellen. Haarnadel-Strukturen im 5'-untranslatierten Bereich der mRNA in der Nähe des ATG können, ebenso wie interne Ribosombindungsstellen, die Translationseffizienz erhöhen.

Die heterologe Expression der vollständigen Ca^{2+} -NDPase der Ratte zeigte, dass das vollständige Protein synthetisiert wurde. Jedoch wurde auch das dritte Startcodon zu einem kleinen Teil, möglicherweise durch „leaky-scanning“ (Kozak M., 1999), genutzt. Heterologe Expression der vollständigen sowie der 5'-trunkierten, mit dem dritten Startcodon beginnenden, Ca^{2+} -NDPase in CHO-Zellen ergab eine identische Substratspezifität sowie die gleiche intrazelluläre Lokalisierung. Dies legt nahe, dass die zelluläre Lokalisierungsinformation zwischen dem dritten Startcodon und dem zweiten hydrophoben Bereich liegen muss und somit von dem RXR-ER-Retentions/Rücktransport-Motiv ausgeht. Daher sind beide Varianten Transmembranproteine, deren katalytische Domänen im Lumen des ER lokalisiert sind.

4.1.2 Ca^{2+} -NDPase: Teil der Qualitätskontrolle im ER ?

Alle sekretierten sowie membranassoziierten Proteine durchlaufen zu Beginn ihrer Biosynthese das endoplasmatische Retikulum, welches wichtige Funktionen bei der Glycosylierung sowie der Faltung der Proteine erfüllt. Die meisten dieser Proteine sind glycosyliert. Im Falle der N-Glycosylierung wird auf ein Asparagin (N-X-[ST]-Kontext) der naszierenden Peptidkette das Oligosaccharid $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ kotranslational transferiert (Lehrman M.A., 2001). Durch diese Glycosylierung gelangt das neusynthetisierte Protein in das umfangreiche System der Qualitätskontrolle des ER. Diese Qualitätskontrolle soll sicherstellen, dass ein neusynthetisiertes Protein richtig prozessiert wurde, bevor es das ER verlässt. Die Faltung des nativen Proteins wird durch Chaperone, die schon während der Translation an die Oligosaccharide binden können, unterstützt. Nachdem die endständigen zwei Glucosereste durch die ER-Glucosidase I und II abgespalten wurden, können die Chaperone Calnexin und Calreticulin an das monoglucosylierte Hochmannose-Intermediat binden (Yamashita K. et al., 1999). Nach Abspaltung des verbliebenen Glucoserestes durch ER Glucosidase II erfolgt eine Qualitätskontrolle des prozessierten Proteins durch Bindung des ER-Faltungssensors UDP-Glucose:glycoproteinglucosyltransferase (GT) an das Hochmannose-Intermediat $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Trombetta E.S und Helenius A., 2000; Ritter C. und Helenius A., 2000). GT erkennt hydrophobe Bereiche des neusynthetisierten Proteins, welche in der nativen Konformation nicht vorhanden sind. Durch Übertragung eines Glucoserestes von UDP-Glucose auf das Hochmannose-Intermediat durchlaufen nicht korrekt gefaltete Proteine eine neue Runde des Calnexin/Calreticulin-Zykluses. Neu synthetisierte Proteine können mehrere Zyklen der De- und Reglucosylierung durchlaufen bevor sie als Hochmannose-Intermediat den ER-Faltungssensor UDP-Glucose:glycoproteinglucosyltransferase passieren und den Golgi-Apparat erreichen. Die GT ist im ER sowie in Prägolgi-Strukturen lokalisiert und fungiert dort als letzte Stufe der Qualitätskontrolle vor dem Eintritt in den Golgi-Apparat (Zuber C. et al., 2001).

Die Ca^{2+} -NDPase dürfte zusammen mit der NTPDase5 (Trombetta E.S. und Helenius A., 1999) einen wichtigen Bestandteil der Qualitätskontrolle neu synthetisierter glycosylierter Proteine darstellen, in dem sie UDP zu UMP hydrolysiert. Die UDP-Glucose:glycoprotein glucosyltransferase wird durch ihr Produkt UDP inhibiert. Eine UDP-Konzentration in der Größenordnung des K_m -Wertes der Ca^{2+} -NDPase (216 μM) inhibiert die GT zu 50 % (Trombetta E.S. und Helenius A., 1999). Das resultierende UMP wird benötigt, um das im Zytosol synthetisierte Substrat UDP-Glucose der GT mittels eines Antiporters ins ER zu transportieren (Castro O. et al., 1999; Hirschberg C.B. et al., 1998).

Die Ca^{2+} -NDPase ist zusammen mit den NTPDasen4 bis 7 ein weiteres Mitglied intrazellulärer Nukleotidasen. Während die UTP-, CTP- und GTP-hydrolysierende NTPDase7 in nicht näher charakterisierten intrazellulären vesikulären Kompartimenten vorliegt (Shi J.D. et al, 2001), konnten die intrazellulären NDPasen der E-NTPDase-Familie im ER oder Golgi-Apparat lokalisiert werden. Dabei ist es interessant, dass sowohl im ER als auch im Golgi-Apparat jeweils zwei unterschiedliche NDPasen vorkommen.

So liegen im ER die in dieser Arbeit klonierte und charakterisierte Ca^{2+} -NDPase sowie die NTPDase5 vor (Trombetta E.S. und Helenius A., 1999). Die Ca^{2+} -NDPase ist ein Transmembranprotein, dessen katalytische Aktivität eine strikte Ca^{2+} -Ionen-Abhängigkeit aufweist. Die NTPDase5 zeigt eine Typ II-Transmembrantopologie. Sie besitzt eine N-terminale Transmembrandomäne gefolgt von einer Signalpeptidsequenz zu Beginn ihres langen luminalen C-Terminus. Heterologe Expression der NTPDase5 in COS-7-Zellen zeigte eine Sekretion der löslichen Isoform (Mulero J.J. et al., 2000, 1999). Trombetta und Helenius zeigten 1999 anhand von ER-Membranfraktionen der Rattenleber, dass 60 % der Ca^{2+} -UDPase-Aktivität des endoplasmatischen Retikulums auf eine lösliche ER-UDPase zurückzuführen ist. Desweiteren konnten sie die NTPDase5 nach heterologer Expression in CHO-Zellen innerhalb des ER lokalisieren. Im Gegensatz zur Ca^{2+} -NDPase kann die NTPDase5 gleichermaßen durch Mg^{2+} - sowie Ca^{2+} -Ionen aktiviert werden (Mulero J.J. et al., 1999).

Beide Enzyme weisen eine unterschiedliche Gewebeverteilung ihrer mRNA auf. Während die mRNA der Ratten- Ca^{2+} -NDPase besonders stark in Gehirn, Lunge und Niere nachgewiesen werden konnte, zeigte die mRNA der humanen NTPDase5 eine besonders starke Ausprägung in Leber, Niere und Testis (Chadwick B.P. et al., 1998). RT-PCR-Analysen der NTPDase5 der Maus ergaben eine große mRNA-Menge ebenfalls in Leber, Niere sowie der Lunge (Trombetta E.S. und Helenius A., 1999). Im Gehirn der Maus lag eine deutlich geringere mRNA-Menge vor. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der GT-Verteilung deuten auf eine mögliche Subkompartimentierung des endoplasmatischen Retikulum hin (Zuber C. et al., 2001). Es ist daher möglich, dass neben der unterschiedlichen Gewebeverteilung der beiden UDPasen, beide Enzyme eine unterschiedliche Lokalisierung innerhalb des ER aufweisen. Die Ca^{2+} -NDPase enthält ein RXR-ER-Retentions/Rücktransportmotiv. Dagegen ist der Mechanismus der ER-Lokalisierung sowohl der membranständigen als auch der löslichen Isoform der NTPDase5 unklar.

Der Golgi-Apparat, in dem weitere Glycosylierungsreaktionen stattfinden, zeigt hinsichtlich seiner NDPase-Aktivitäten erstaunliche Parallelen zum endoplasmatischen Retikulum. Auch im Golgi-Apparat konnten zwei unterschiedliche NDPasen lokalisiert werden. Wang und Guidotti klonierten und charakterisierten die humane NTPDase4 (Golgi-UDPase; Wang T.F. und Guidotti G., 1998a), welche das humane Homolog der 1982 von Brandan und Fleischer in Golgi-Präparationen der Rattenleber funktionell charakterisierten Nucleosiddiphosphatase sein dürfte. Die NTPDase4 ist ein Typ II-Transmembranprotein des Golgi-Apparates. Die katalytische Aktivität dieses Membranproteins lässt sich durch Ca^{2+} -Ionen jedoch kaum durch Mg^{2+} -Ionen stimulieren (Wang T.F. und Guidotti G., 1998a). Insofern kann man die NTPDase4 als funktionelles Golgi-Analog der Ca^{2+} -NDPase des endoplasmatischen Retikulums betrachten. Desweiteren konnte innerhalb des Golgi-Apparates die NTPDase6 lokalisiert werden (Braun N. et al, 2000a), welche bevorzugt GDP hydrolysiert. Diese liegt, wie im Falle der NTPDase5, als Typ II-Transmembranprotein sowie als lösliche teilweise sekretierte Isoform vor und kann ebenso wie diese entweder durch Ca^{2+} -Ionen oder Mg^{2+} -Ionen stimuliert werden.

Somit zeigen beide Organellen eine membrangebundene Ca^{2+} -abhängige NDPase-Aktivität (Ca^{2+} -NDPase des ER sowie NTPDase4 des Golgi-Apparates) sowie eine Ca^{2+} - oder Mg^{2+} -stimulierte membrangebundene oder lösliche NDPase-Aktivität (NTPDase5 des ER sowie NTPDase6 des Golgi-Apparates).

Die NDPasen des Golgi-Apparates dürften durch Hydrolyse der Glycosylierungsprodukte GDP und UDP zu den entsprechenden Nukleosid-monophosphaten, welche als Antiporter für den entsprechenden Import der GDP- und UDP-Zuckerverbindungen benötigt werden (Hirschberg C.B., 2001; Toma L. et al., 1996; Puglielli L. et al., 1999), eine ähnlich entscheidende Rolle für die posttranslationale Proteinmodifikation besitzen, wie die NDPasen des ER.

4.2 Analyse der Quatärstrukturen von NTPDase1 und 2 nach heterologer Expression in *Xenopus laevis*-Oocyten

Die Proteinsequenzen der NTPDase1 und 2 zeigen jeweils eine Transmembrandomäne an ihrem N- sowie C-Terminus (Kegel B. et al., 1997). Der größte Teil der Proteine sowie ihre katalytische Domäne liegen auf der von den Transmembrandomänen flankierten extrazellulären Seite der Plasmamembran (Heine P. et al., 1999). Die Multimerstrukturen der NTPDase1 und 2 wurden bisher anhand von Cross-Linking-Experimenten mit Membranfraktionen nach heterologer Expression untersucht (Wang T.F., Ou Y. und Guidotti G., 1998; Kirley T.L. et al., 1999). Die Multimerstruktur der heterolog exprimierten NTPDase1 wurde zusätzlich nach Digitonin-Solubilisierung und Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation untersucht (Wang T.F., Ou Y. und Guidotti G., 1998). Diese Untersuchungen erfassen jedoch nicht strikt den zelloberflächenständigen Pool des Enzyms. Es wäre durchaus denkbar, dass das Enzym im Endomembransystem eine andere Multimerstruktur aufweist als an der Zelloberfläche. So untersuchten Horiuchi et al. (2001) den neuronalen Glycintransporter GlyT2 sowie dessen giales Homologes GlyT1 nach heterologer Expression in *Xenopus laevis*-Oocyten anhand metabolischer Markierung sowie nach Zelloberflächen-Iodierung. Sie konnten

mittels der Blau-nativen Gelelektrophorese zeigen, dass beide Glycintransporter an der Zelloberfläche als Monomere vorliegen, wohingegen sich Intrazellulär ein signifikanter Anteil der Proteine als Oligomer findet. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals die NTPDase1 und 2 der Ratte nach metabolischer Markierung und nach Markierung der zelloberflächenständigen Proteine mittels Blau-nativer Gelelektrophorese analysiert.

4.2.1 Quatärstrukturen der NTPDase1 und 2

4.2.1.1 Quatärstruktur der NTPDase1 der Ratte

Wang, Ou und Guidotti (1998) untersuchten die Multimerstruktur der NTPDase1 der Ratte anhand grober Membranfraktionen nach heterologer Expression in COS-7-Zellen. Sie erhielten mittels Glutardialdehyd-Cross-Linking der Membranfraktionen ein multimeres Verteilungsmuster bis zum Tetramer. Desweiteren konnten sie zeigen, dass der durch Triton X-100-Solubilisierung erfolgte 90 %ige Aktivitätsverlust der NTPDase1 ausschließlich auf die infolge Solubilisierung entstandenen Monomere zurückgeführt werden kann. Dagegen ergab die Solubilisierung mit Digitonin nur einen minimalen Aktivitätsverlust, einhergehend mit einem multimeren Verteilungsmuster bis zum Tetramer (Wang T.F., Ou Y. und Guidotti G., 1998). Aufgrund dieser Daten sowie der von ihnen durchgeführten Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugationen postulierten die Autoren für die native NTPDase1 eine tetramere Struktur. Außerdem zeigten sie, dass die Aktivität rekombinanter Enzyme mit nur einer Transmembrandomäne sowie die einer löslichen sekretierten Form nicht mehr durch Triton X-100 inhibiert wird. Jedoch wiesen diese rekombinanten Enzyme in Vergleich zur nativen NTPDase1 eine deutlich geringere Aktivität auf. Daher scheinen beide Transmembrandomänen für die Bildung der Multimerstruktur benötigt zu werden, welche ihrerseits die katalytischen Eigenschaften beeinflusst.

Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung der Multimerstruktur für die katalytische Aktivität der NTPDase1 beruht darauf, dass nach heterologer Expression des Enzyms in CHO-Zellen ATP an der Zelloberfläche unter Orthophosphatfreisetzung direkt zu AMP hydrolysiert wird (Heine P. et al., 1999). Dagegen setzte eine heterolog exprimierte, rekombinante, lösliche und sekretierte Form der NTPDase1 während der ATP-Hydrolyse ADP frei (Chen W. und Guidotti G., 2001). Daraus geht hervor, dass die Oligomerstruktur nicht nur die Enzymaktivität sondern auch die Substratspezifität bzw. die Produktbildung beeinflusst.

Die Tetramerstruktur der NTPDase1 konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Nach heterologer Expression in *Xenopus laevis*-Oocyten wurde intrazellulär als dominantes Oligomer das Dimer identifiziert. Daneben fanden sich ein Monomeranteil sowie nach längerer Expression ein minimaler Trimeranteil. Dem entgegen fand sich an der Zelloberfläche als höchstes Oligomer das Dimer. Desweiteren wurde gezeigt, dass die Multimere der NTPDase1 der Ratte nicht intermolekular über S-S-Brücken verknüpft sind. Die mit Digitonin solubilisierten und über Ni^{2+} -NTA-Chromatographie gereinigten Homomultimere der NTPDase1 zeigten sich relativ stabil. Eine Inkubation bei 37°C ergab mit zunehmender Dauer eine fortschreitende, jedoch auch nach zwei Stunden noch nicht vollständige Dissoziation der Dimere. Die Inkubation der NTPDase1 bei 37°C unter reduzierenden Bedingungen (100 mM DTT) führte ebenfalls nicht zur vollständigen Dissoziation. Erst eine Inkubation bei 37°C in Gegenwart von DTT (100 mM) und des BN-Probenpuffers vermochte eine vollständige Dissoziation der NTPDase1 zu bewirken. Zur vollständigen Dissoziation der Multimerstruktur der NTPDase1 wurden somit das Reduktionsmittel DTT und die unter diesen Bedingungen denaturierende Wirkung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 benötigt. Ausgehend von diesen Daten ist es wahrscheinlich, dass die NTPDase1 der Ratte nativ nicht als Tetramer sondern vielmehr als Dimer vorliegt.

4.2.1.2 Quatärstruktur der NTPDase2 der Ratte

Untersuchungen der Multimerstruktur der in COS-Zellen heterolog exprimierten NTPDase2 des Huhns ergaben eine multimere Struktur (Kirley T.L. et al., 1999). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der komplex glycosylierten NTPDase2 des Huhns durch Cross-Linking um das 2,4fache und durch Bindung des Lektins Con A um das 2,9fache gesteigert wird. Dabei geht die Steigerung der Aktivität mittels Cross-Linking einher mit der Zunahme der multimeren Struktur. Caldwell C.C. et al. (2001) untersuchten die Auswirkungen verschiedener Substanzen auf die Aktivität der NTPDase2 des Hühnermuskelmagens. Membranfraktionen des Hühnermuskelmagens hatten bei physiologischen Temperaturen (37 – 40°C) eine relativ geringe ATPase-Aktivität, die jedoch durch Cross-Linking oder Con A deutlich gesteigert werden konnte. Interessanterweise zeigte die Hühner-NTPDase2 eine deutliche Inaktivierung oberhalb von 25°C, welche ebenfalls durch Cross-Linking oder Con A aufgehoben werden konnte. Aufgrund dieser Daten folgerten sie, dass unter physiologischen Bedingungen die NTPDase2 im nativen Zustand in einer Mischung aus Monomer und Dimer vorliegt. Die Steigerung der Aktivität durch Cross-Linking oder Con A beruhe auf einer durch diese hervorgerufene bevorzugte Bildung höhere Multimere bis zum Tetramer. Nach diesem Modell würde die NTPDase2-Aktivität vom Monomer zum Tetramer ansteigen. Desweiteren bestünde die Möglichkeit, dass die NTPDase2-Aktivität *in vivo* nicht konstant ist, sondern durch physiologische Einflüsse bestimmt wird, welche den Oligomerisierungszustand beeinflussen.

Anhand heterologer Expression in *Xenopus laevis*-Oocyten wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die NTPDase2 der Ratte keine distinkte Multimerstruktur bildet. Vielmehr wurde durch die Blau-native Gelelektrophorese nachgewiesen, dass im nativen Zustand an der Zelloberfläche gleichzeitig Di-, Tri- und Tetramere vorliegen. Dieses Ergebnis wird durch einen Vergleich mit den Ergebnissen der Blau-nativen Gelelektrophorese der P2X₁- und P2X₃-Rezeptoren erhärtet (Nicke A. et al., 1998). Diese Rezeptoren liegen an der Zelloberfläche ausschließlich als Trimer vor.

Die Multimere der NTPDase2 sind ebenso wie die der NTPDase1 nicht intermolekular über S-S-Brücken verknüpft. Desweiteren wurde nachgewiesen, dass Digitonin-solubilisierete Homomultimere der NTPDase2 deutlich stabiler sind als das Homomultimer der NTPDase1. Inkubation der multimeren NTPDase2 bei 37°C zeigten keine nennenswerte Dissoziation. Selbst Inkubationen in Gegenwart von DTT (100 mM) mit oder ohne Blau-nativen-Probenpuffer führten, im Gegensatz zur NTPDase1, nicht zu einer vollständigen Dissoziation der Multimerstrukturen.

Diese Daten stehen im Widerspruch zu dem von Caldwell et al. (2001) postulierten Modell. Durch Vergleich der Glutardialdehyd-Cross-Linking-Experimente mit denen der Blau-nativen Gelelektrophorese konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass Cross-Linking die Oligomerverteilung nicht zu höheren Multimeren verschiebt. Vielmehr fixiert Glutardialdehyd-Cross-Linking nur die Digitonin-solubilisierten Multimerkomplexe. Desweiteren würde das von Caldwell et al. (2001) postulierte Modell eine relativ schwache Bindung der Untereinheiten voraussetzen, da zur Bildung höherer Oligomere die stabilisierende Wirkung zum Beispiel eines Lektins benötigt würde. Diese Arbeit zeigt jedoch, dass die NTPDase2-Multimere über eine recht starke nicht-kovalente Bindung verfügen. Leider liefern Caldwell et al. (2001) zu ihren Aktivitätsmessungen keinerlei Daten hinsichtlich der entsprechenden Multimerstrukturen. Daher ist es durchaus möglich, dass die beschriebenen Effekte nicht durch eine Änderung der Multimerstrukturen sondern durch eine Konformationsänderung der Untereinheiten bestehender Multimerstrukturen hervorgerufen werden.

Im Vergleich zu den oben beschriebenen Multimerstrukturen der NTPDase1 und NTPDase2 ergaben Untersuchungen der Quatärstruktur der humanen NTPDase3 ein Dimer-Dimer-Modell (Murphy D.M. et al., 2002). Dabei besteht die native tetramere NTPDase3 aus dem Dimer eines intermolekular S-S-verknüpften Dimers. Daraus lässt sich ableiten, dass die drei Zelloberflächen-lokalisierten NTPDasen1 - 3 unterschiedliche Quatärstrukturen aufweisen.

4.2.2 **Änderung der NTPDase2 Substratspezifität als Folge der Änderung des multimeren Verteilungsmusters**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Substratspezifität der NTPDase2 der Ratte sich mit zunehmender Dauer der heterologen Expression in *Xenopus laevis*-Oocyten änderte. Die relative ADPase-Aktivität der NTPDase2 stieg nach sieben Tagen signifikant ($p < 0,0001$) um das vierfache, im Vergleich zum ersten Tag der Expression, an. Dies erniedrigte das ATP:ADP-Verhältnis von 1 : 0,1 nach 24 h Expression zu 1 : 0,4 nach sieben Tagen. Die Änderung der Substratspezifität der NTPDase2- ging mit einer Änderung des multimeren Verteilungsmusters der NTPDase2 einher. Mit zunehmender Expressionsdauer nahm der relative Anteil an höheren Multimeren zu. Dies ließ sich sowohl durch metabolische Markierung als auch durch Markierung der Zelloberfläche nachweisen. Im Gegensatz zur NTPDase2 zeigte die NTPDase1 keine signifikante Änderung ihrer Multimerstruktur, einhergehend mit der Tatsache, dass auch keine funktionelle Änderung eintrat. Die Änderung der Substratspezifität der NTPDase2, aufgrund unterschiedlicher Verteilungsmuster ihrer Multimere, eröffnet eine neue Möglichkeit zur Modulation Nukleotid-vermittelter Signalübertragungen.

Interessanterweise fanden Grinthal und Guidotti (2002) eine ähnliche Verschiebung der Substratspezifität der NTPDase2. So zeigte die wt-NTPDase2 nach dreitägiger heterologer Expression in COS-7-Zellen, in Analogie zu den Untersuchungen dieser Arbeit, ebenfalls ein ATP:ADP-Verhältnis von 1 : 0,1. Triton X-100-Solubilisierung der NTPDase2 inhibierte 80 % der ATPase-Aktivität, jedoch nur 40 % der ADPase-Aktivität. Daraus resultierte für die mit Triton X-100 solubilisierter und als Monomer vorliegende NTPDase2 ein ATP:ADP-Verhältnis von 1 : 0,3. Die rekombinante, lösliche und sekretierte Isoform verhielt sich hinsichtlich ihrer Aktivität und Substratspezifität genauso wie das mit Triton X-100 solubilisierter Enzym. Die von den Autoren beobachtete Verschiebung der Substratspezifität geht im Gegensatz zu der in dieser Arbeit beschriebenen allerdings nicht mit einem Anteil höherer Oligomere einher. Sie ist vielmehr die Folge des monomeren Status der NTPDase2. Diese Ergebnisse werfen neue Fragen auf. Ist es möglich, dass es unterschiedliche Wege zur Regulation der Enzymaktivität der NTPDasen gibt ? So könnte die

Aktivität der NTPDase2 eine Variable sowohl der Multimerstruktur als auch unterschiedlicher Konformationsänderungen der einzelnen Untereinheiten durch modifizierende Substanzen sein. Dieser Fragestellung lässt sich ohne adäquate 3D-Struktur-Modelle jedoch nicht hinreichend nachgehen.

4.2.3 NTPDase1/NTPDase2 Heteromultimere

Die NTPDase1 und 2 zeigen eine mit den ionotropen P2X-Rezeptoruntereinheiten vergleichbare Membrantopographie (Zimmermann H., 2000; Robertson S.J. et al., 2001). Die funktionellen Liganden-aktivierten P2X-Ionenkanäle werden durch Homo- und Heteromultimerbildung der P2X-Untereinheiten gebildet (Nicke A. et al., 1998; Robertson S.J. et al., 2001). Aufgrund der Homologie der Membrantopologie wurde in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit der Bildung eines NTPDase1/NTPDase2-Heteromultimers untersucht. Hierzu wurden Kopräzipitationsversuche nach heterologer Expression in *Xenopus laevis*-Oocyten durchgeführt. Im Falle einer Heterooligomerbildung war eine Koisolierung der in Digitonin solubilisierten wt-NTPDase2 mit der His₆-NTPDase1 zu erwarten. Es gelang zwar, nach heterologer Expression eine geringe Menge wt-NTPDase2 mit der His₆-NTPDase1 zu kopräzipitieren. Jedoch sprachen der geringe Anteil an wt-NTPDase2 im Kopräzipitat sowie die Tatsache, dass auch die heterologe Expression der wt-NTPDase2 allein nach Ni²⁺-NTA-Chromatographie im Western-Blot ein immunoreaktives Signal ergab, gegen eine signifikante Tendenz zur Heteromultimerbildung. Vermutlich sind die beiden Transmembrandomänen allein nicht ausschlaggebend für die Oligomerbildung. Vielmehr dürfte die Ausbildung der Oligomerstruktur durch ein Zusammenspiel der entsprechenden Transmembrandomänen mit intra- oder extrazellulären Domänen kontrolliert werden. Hierfür spricht auch, dass nicht alle P2X-Untereinheiten in der Lage sind, mit anderen Untereinheiten Heterooligomere zubilden (Robertson S.J. et al., 2001). Die P2X₇-Untereinheiten können sogar nur Homomultimere bilden. Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung außerhalb der Transmembrandomänen enthaltener struktureller Informationen lieferten Untersuchungen einer NTPDase2/ NTPDase1-Chimäre. Grinthal und Guidotti (2002) exprimierten in COS-7-Zellen eine Chimäre

aus der extrazellulären Domäne der NTPDase2 sowie den Transmembrandomänen und intrazellulären Domänen der NTPDase1. Diese hatte nur 5 % der ATPase-Aktivität der wt-NTPDase2. Nach Triton X-100-Solubilisierung zeigte sie jedoch die gleiche Aktivität und Substratspezifität wie die Triton X-100-solubilisierter wt-NTPDase2.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte eine neue Ca^{2+} -abhängige NDPase (EC 3.6.1.6) kloniert und funktionell charakterisiert werden. Die mRNA der Ca^{2+} -NDPase wurde in allen untersuchten Geweben der Ratte nachgewiesen. UDP, GDP und IDP, jedoch nicht ATP und ADP waren Substrate der Ca^{2+} -NDPase. Ihre Enzymaktivität war strikt von Calciumionen abhängig und zeigte ein breites pH-Optimum zwischen 6,5 und 7,5. Der K_m -Wert für UDP lag bei 216 μM . Die Ca^{2+} -NDPase konnte im ER und in Prä-Golgi-Strukturen lokalisiert werden. Sie ist ein Transmembranprotein, dessen katalytische Domäne im Lumen des ER liegt. Dort ist sie vermutlich ein wichtiger Bestandteil der Qualitätskontrolle neu synthetisierter glycosylierter Proteine, in dem sie das die UDP-Glucose:glycoproteinglucosyltransferase inhibierende UDP zu UMP hydrolysiert. Das resultierende UMP dient als Antiporter um UDP-Glucose, das im Zytosol synthetisierte Substrat der UDP-Glucose:glycoproteinglucosyltransferase, in das ER zu transportieren.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Oligomerstrukturen der zelloberflächenlokalisierten NTPDase1 und NTPDase2 untersucht. Die Enzyme wurden heterolog in *Xenopus laevis*-Oocyten exprimiert. Nach metabolischer Markierung sowie Zelloberflächenmarkierung wurden die mittels Hexahistidyl-Epitop markierten Proteine durch Digitonin solubilisiert und die Oligomerenkomplexe wurden über Ni^{2+} -NTA-Chromatographie gereinigt. Die gereinigten Proteinkomplexe wurden mittels Cross-Linking-Experimenten und der Blau-nativen Gelelektrophorese analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die NTPDase1 an der Zelloberfläche als Dimer vorlag. Die Dimerisierung erfolgte nicht über intermolekulare S-S-Brücken. Die Dimere der NTPDase1 erwiesen sich als relativ stabil. Inkubation bei 37°C resultierte mit zunehmender Dauer in einer steigenden, jedoch auch nach zwei Stunden noch nicht vollständigen Dissoziation der Dimere. Inkubation unter reduzierenden Bedingungen führte ebenfalls nicht zur vollständigen Dissoziation. Erst eine Inkubation bei 37°C in Gegenwart von DTT und Coomassie Brilliant Blue G250 vermochte eine vollständige Dissoziation der NTPDase1 zu bewirken. Zur

vollständigen Dissoziation der Multimerstruktur der NTPDase1 wurden somit das Reduktionsmittel DTT und die unter diesen Bedingungen denaturierende Wirkung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 benötigt.

Die NTPDase2 bildete kein distinktes Multimer, sondern lag im nativen Zustand an der Zelloberfläche in Form von nicht intermolekular über S-S-Brücken verknüpften Di-, Tri- und Tetrameren vor. Die Homomultimere der NTPDase2 zeigten im Vergleich zur NTPDase1 eine deutlich höhere Stabilität. Inkubation unter reduzierenden Bedingungen und in Gegenwart von Coomassie Brilliant Blue G250 führte im Gegensatz zur NTPDase1 nur zu einer unwesentlichen Dissoziation der Multimerstrukturen. Die Substratspezifität der NTPDase2 änderte sich mit zunehmender Dauer der heterologen Expression. Die ADPase-Aktivität der NTPDase2 stieg nach sieben Tagen signifikant ($p < 0,0001$) um das vierfache im Vergleich zum ersten Tag der Expression. Dies erniedrigte das ATP:ADP-Verhältnis von 1 : 0,1 nach 24 h Expression zu 1 : 0,4 nach sieben Tagen. Die Änderung der Substratspezifität der NTPDase2 ging mit einer Änderung des multimeren Verteilungsmusters der NTPDase2 einher. Mit zunehmender Expressionsdauer nahm der relative Anteil an höheren Multimeren zu. Im Gegensatz zur NTPDase2 zeigte die NTPDase1 keine signifikanten Änderungen ihrer Substratspezifität und Multimerstruktur. Die durch unterschiedliche Verteilungsmuster der Multimere bedingte Änderung der Substratspezifität der NTPDase2 eröffnet eine neue Möglichkeit zur Modulation Nukleotid-vermittelter Signalübertragung. Es konnte keine signifikante Tendenz zur Ausbildung von Heteromultimeren aus NTPDase1 und NTPDase2 nachgewiesen werden.

A Anhang

A.1 Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
Amp ^r	Ampicillinresistenzgen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin)
cDNA	komplementäre DNA
CDP	Cytidin-5'-diphosphat
CHO	Chinese hamster ovary-Zelllinie
Ci	Curie
CIAP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
cfu	Kolonie bildende Einheit (Colony forming units)
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CMV	Cytomegalievirus
cpm	counts per minute
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
cRNA	komplementäre RNA
Cy3	Indocarbocyanin-3
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
D	Dalton
d	Tag
DABCO	1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]-octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat

DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DOC	Desoxycholat
dpm	Radioaktive Zerfälle pro Minute
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
Endo H	Endo-β-N-acetylglucosaminidase H
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EST	expressed sequence tag's – kurze mRNA Bruchstücke
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fötale Rinderserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
H ₂ O _{bidest}	demineralisiertes und destilliertes Wasser
H ₂ O _{demin}	demineralisiertes Wasser
H ₂ O _{DEPC}	DEPC-behandeltes Wasser
H ₂ O _{milliQ}	ultrareines Wasser (Millipore, Widerstand 18,2 MΩ)
HS	Pferdeserum
h	Stunde
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinoethansulfonsäure
IMAC	immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kbp	Kilo Basenpaare
kD	Kilo Dalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante

MCS	multiple cloning site
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
mRNA	boten RNA
MS222	3-Aminobezoesäureethylester
NDP	Nucleosid-5'-diphosphat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nt	Nukleotid
NTP	Nucleosid-5'-triphosphat
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pefabloc SC	4-(2-Aminoethyl)-benzylsulfonylfluorid Hydrochlorid
pI	isoelektrischer Punkt
P _i	Orthophosphat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PNGase F	Peptid-N ⁴ -(N-acetyl-β-glucosaminy)asparagin-Amidase F
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
ssDNA	Einzelsträngige DNA
Sulfo-SSHP	Sulfosuccinimidyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat
SV40	Simian Virus 40
TCA	Trichloressigsäure

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Einheit der Enzymaktivität (Units)
UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett
V	Volt
WGA	Wheat germ agglutinin
wt	Wildtyp
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

A.2 Zitate

- Aurup H., Siebert A., Benseler F., Williams D. und Eckstein F.** (1994) Translation of 2'-modified mRNA in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Research* 22, 4963 - 8
- Bairoch A., Bucher P. and Hofmann K.** (1997) The PROSITE database, its status in 1997. *Nucleic Acids Research* 25(1), 217 - 21
- Bichet D., Cornet V., Geib S., Carlier E., Volsen S., Hoshi T., Mori Y. und De Waard M.** (2000) The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 25, 177 - 90
- Biederbick A., Kosan C., Kunz J. und Elsasser H.P.** (2000) First apyrase splice variants have different enzymatic properties. *The Journal of Biological Chemistry* 275(25), 19018 - 24
- Biederbick A., Rose S. und Elsasser H.P.** (1999) A human intracellular apyrase-like protein, LALP70, localizes to lysosomal/autophagic vacuoles. *J Cell Sci.* 112 (15), 2473 - 84
- Birnboim H.C. und Doly J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7, 1513 - 23.
- Berninsone P. und Hirschberg C.B.** (1998) Nucleotide sugars, nucleotide sulfate, and ATP transporters of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Ann N Y Acad Sci.* 842, 91 - 9
- Bordier C.** (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton-X-114 solution. *The Journal of Biological Chemistry* 256, 1604 - 7
- Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248 - 54
- Brandan E. und Fleischer B.** (1982) Orientation and role of nucleoside-diphosphatase and 5'-nucleotidase in golgi vesicles from rat liver. *Biochemistry* 21, 4640 - 5

- Braun N., Fengler S., Ebeling C., Servos J. und Zimmermann H. (2000a)** Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. *Biochem J.* 351(3), 639 - 47
- Braun N., Sevigny J., Robson S.C., Enjyoji K., Guckelberger O., Hammer K., Di Virgilio F. und Zimmermann H. (2000b)** Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain. *Eur J Neurosci.* 12(12), 4357 - 66
- Caldwell C.C., Hornyak S.C., Pendleton E., Campbell D. und Knowles A.F. (2001)** Regulation of chicken gizzard ecto-ATPase activity by modulators that affect its oligomerization status. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 387(1), 107 - 16
- Cannon K.S. und Helenius A. (1999)** Trimming and readdition of glucose to N-linked oligosaccharides determines calnexin association of a substrate glycoprotein in living cells. *The Journal of Biological Chemistry* 274(11), 7537 - 44
- Castro O., Chen L.Y., Parodi A.J. und Claudia Abeijón (1999)** Uridine diphosphate–glucose transport into the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*: in vivo and in vitro evidence. *Molecular Biology of the Cell* 10, 1019 - 30
- Chadwick B.P. und Frischauf A.M. (1998)** The CD39-like gene family: identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), their murine homologues, and a member of the gene family from *Drosophila melanogaster*. *Genomics* 50, 357 - 67
- Charlab R., Valenzuela J.G., Rowton E. und Ribeiro J.M.C. (1999)** Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *PNAS* 96(26), 15155 - 60
- Chen W., Guidotti G. (2001)** Soluble apyrases release ADP during ATP hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 282(1), 90 - 5
- Chomczynski P. und Sacchi N. (1987)** Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156 – 9
- Claros M.G. und von Heijne G. (1994)** TopPred II: An improved software for membrane protein structure predictions. *CABIOS* 10, 685 - 6
- Colman A. (1984)** Translation of eukaryotic messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Transcription and translation*, IRL Press Ltd., Oxford

- Cunha R.A. und Ribeiro J.A.** (2000) ATP as a presynaptic modulator. *Life Sciences* 68, 119 - 37
- Fields R.D. und Stevens B.** (2000) ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. *Trends in Neurosciences* 23(12), 625 - 33
- Gloor S., Pongs O. und Schmalzing G.** (1995) A vector for the synthesis of cRNAs encoding Myc epitope-tagged proteins in *Xenopus laevis* oocytes. *Gene* 160, 213 – 7
- Gomord V., Wee E. und Faye L.** (1999) Protein retention and localization in the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Biochimie* 81, 607 - 18
- Gorelick F.S. und Shugrue C.** (2001) Exiting the endoplasmic reticulum. *Molecular and Cellular Endocrinology* 177, 13 - 8
- Grinthal A, Guidotti G.** (2002) Transmembrane domains confer different substrate specificities and adenosine diphosphate hydrolysis mechanisms on CD39, CD39L1, and chimeras. *Biochemistry* 41(6), 1947 - 56
- Grinthal A, Guidotti G.** (2000) Substitution of His59 converts CD39 apyrase into an ADPase in a quaternary structure dependent manner. *Biochemistry* 39(1), 9 - 16
- Hardt B. und Bause E.** (2002) Lysine can be replaced by histidine but not by arginine as the ER retrieval motif for type I membrane proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291, 751 - 7
- Hauri H.-P., Appenzeller C., Kuhn F. und Nufer O.** (2000) Lectins and traffic in the secretory pathway. *FEBS Letters* 476, 32 - 7
- Honigberg S.M., Rao B.J. und Radding C.M.** (1986) Ability of RecA protein to promote a search for rare sequences in duplex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9586 - 90
- Heine P., Braun N., Heilbronn A. und Zimmermann H.** (1999) Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur. J. Biochem.* 262, 102 - 7
- Hicks-Berger C.A., Chadwick B.P., Frischauf A.M. und Kirley T.L.** (2000) Expression and characterization of soluble and membrane-bound human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (CD39L2). *The Journal of Biological Chemistry* 275(44), 34041 - 5
- Hirschberg C.B.** (2001) Golgi nucleotide sugar transport and leukocyte adhesion deficiency II. *The Journal of Clinical Investigation* 108(1), 3 - 6

- Hirschberg C.B., Robbins P.W. und Abeijon C.** (1998) Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem.* 67, 49 - 69
- Horiuchi M., Nicke A., Gomeza J., Aschrafi A., Schmalzing G. und Betz H.** (2001) Surface-localized glycine transporters 1 and 2 function as monomeric proteins in *Xenopus* oocytes. *PNAS* 98(4), 1448 - 53
- Jacobs G.H., Rackham O., Stockwell P.A., Tate W. und Brown C.M.** (2002) Transterm: a database of mRNAs and translational control elements. *Nucleic Acids Research* 30(1), 310 - 11
- Jeanmougin F., Thompson J.D., Gouy M., Higgins D.G. und Gibson T.J.** (1998) Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci.* 23, 403 - 5
- Kappeler F., Itin C., Schindler R. und Hauri H.-P.** (1994) A dual role for COOH-terminal lysine residues in pre-golgi retention and endocytosis of ERGIC-53. *The Journal of Biological Chemistry* 269(9), 6279 - 81
- Kappeler F., Klopfenstein D.R.C., Foguet M., Paccaud J.-P. und Hauri H.-P.** (1997) The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 272(50), 31801 - 8
- Kegel B., Braun N., Heine P., Maliszewski C.R. und Zimmermann H.** (1997) An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology* 36(9), 1189 - 1200
- Keller S.H., Lindstorm J., Ellisman M. und Taylor P.** (2001) Adjacent basic amino acid residues recognized by the COP I complex and ubiquitination govern endoplasmic reticulum to cell surface trafficking of the nicotinic acetylcholine receptor α -subunit. *The Journal of Biological Chemistry* 276(21), 18384 - 91
- Kennedy C., Todorov L.D., Hihaylova-Todorova S. und Sneddon P.** (1997) Release of soluble nucleotidases: a novel mechanism for neurotransmitter inactivation? *Trend in Pharmacological Sciences* 18, 263 - 6
- Kennedy C., Westfall T.D. und Sneddon P.** (1996) Modulation of purinergic neurotransmission by ecto-ATPase. *The Neurosciences* 8, 195 -9
- Kirley T.L., Gerber L.K. und Smith T.M.** (1999) Expression and characterization of chicken muscle ecto-ATPase in mammalian COS cells. *IUBMB Life* 48, 67 - 72
- Kozak M.** (2000) Do the 5'untranslated domains of human cDNAs challenge the rules for initiation of translation (or is it vice versa)? *Genomics* 70(3), 396 - 406

- Kozak M.** (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234(2), 187 - 208
- Kozak M.** (1997) Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J.* 16(9), 2482 - 92
- Kozak M.** (1996) Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mammalian Genome* 7, 563 - 74
- Kozak M.** (1995) Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(7), 2662 – 6
- Kozak M.** (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research* 15, 8125 – 48
- Kozak M.** (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Research* 12, 857 – 72
- Kozak M.** (1981) Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Research* 9, 5233 - 62
- Kozak M.** (1978) How do eukaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* 15, 1109 - 23
- Kyhse-Andersen J.** (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203 - 9
- Kyte J. und Doolittle R.F.** (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 157(1), 105 - 32.
- Lanzetta P.A., Alvarez L.J., Reinach, P.S., Candia, O.A.** (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Analytical Biochemistry* 100(1), 95 - 7
- Lehrman M.A.** (2001) Oligosaccharide-based information in endoplasmic reticulum quality control and other biological systems. *The Journal of Biological Chemistry* 276(12), 8623 – 6
- Lewis Carl S.A., Smith T.M. und Kirley T.L.** (1998) Cross-linking induces homodimer formation and inhibits enzymatic activity of chicken stomach ecto-apyrase. *Biochem Mol Biol Int.* 44(3), 463 - 70
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. und Randall R.J.** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265 - 75

- Mans B.J., Coetzee J., Louw A.I., Gaspar A.R.M. und Neitz A.W.H.** (2000) Disaggregation of aggregated platelets by apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Experimental and Applied Acarology* 24, 271 - 82
- Margeta-Mitrovic M., Jan Y.N. und Jan L.Y.** (2000) A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27, 97 - 106
- Michal G. (Hrsg.)** (1999) Biochemical pathways. *Spektrum Akademischer Verlag*
- Möller S., Croning M.D.R. und Apweiler R.** (2002) Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* 18(1), 218
- Möller S., Croning M.D.R. und Apweiler R.** (2001) Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* 17(7), 646 – 53
- Monnat J., Neuhaus E.M., Pop M.S., Ferrari D.M., Kramer B. und Soldati T.** (2000) Identification of a novel saturable endoplasmic reticulum localization mechanism mediated by the C-terminus of a *Dictyostelium* protein disulfide isomerase. *Molecular Biology of the Cell* 11, 3469 - 84
- Mulero J.J., Yeung G., Nelken S.T., Bright J.M., Daniel W. McGowan D.W. und Ford J.E.** (2000) Biochemical Characterization of CD39L4. *Biochemistry* 39, 12924 – 8
- Mulero J.J., Yeung G., Nelken S.T. und Ford J.E.** (1999) CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. *The Journal of Biological Chemistry* 274(29), 20064 - 7
- Mullis K.B.** (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262, 56 - 65
- Mullis K.B. und Faloona F.** (1987) Synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335 - 50
- Murphy D.M., Ivanenkov V.V. und Kirley T.L.** (2002) Identification of cysteine residues responsible for oxidative cross-linking and chemical inhibition of human nucleoside-triphosphate diphosphohydrolase 3. *The Journal of Biological Chemistry* 277(8), 6162 – 9
- Nicholas R.A.** (2001) Identification of the P2Y₁₂ receptor: a novel member of the P2Y family of receptors activated by extracellular nucleotides. *Mol Pharmacol* 60, 416 - 20

- Nicke A., Bäumert H.G., Rettinger J., Eichele A., Lambrecht G., Mutschler E. und Schmalzing G. (1998)** P2X₁ and P2X₃ receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *The EMBO Journal* 17(11), 3016 - 28
- Nielsen H., Brunak S. und von Heijne G. (1999)** Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Protein Engineering* 12, 3 - 9
- Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S. und von Heijne G. (1997)** Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10, 1 - 6
- Nufer O., Guldbrandsen S., Degen M., Kappeler F., Paccaud J.-P., Tani K. und Hauri H.-P. (2002)** Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export. *Journal of Cell Science* 115(3), 619 - 28
- Page, R.D.M. (1996)** TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12, 357 - 8
- Parodi A.J. (2000)** Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochemical Journal* 348, 1 - 13
- Peri S. und Pandey A. (2001)** A reassessment of the translation initiation codon in vertebrates. *Trends in Genetics* 17(12), 685 - 7
- Pesole G., Mignone F., Gissi C., Grillo G., Licciulli F. und Liuni S. (2001)** Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene* 276, 73 - 81
- Peterson G.L. (1983)** Determination of total protein. *Methods in Enzymology* 91, 95 - 119
- Peterson G.L. (1979)** Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry* 100(2), 201 - 20
- Peterson G.L. (1977)** A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83(2), 346 - 56
- Preiss T. und Hentze M.W. (1999)** From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes. *Current Opinion in Genetics & Development* 9, 515 - 21
- Puglielli L. und Hirschberg C.B. (1999)** Reconstitution, identification, and purification of the rat liver golgi membrane GDP-fucose transporter. *The Journal of Biological Chemistry* 274(50), 35596 - 600

- Reddy P.S. und Corley R.B.** (1998) Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum. *BioEssays* 20, 546 - 54
- Rigas B., Welcher A., Ward D. und Weissman S.** (1986) Rapid plasmid library screening using RecA-coated biotinylated probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9591 - 5
- Ritter C. und Helenius A.** (2000) Recognition of local glycoprotein misfolding by the ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *Nature Structural Biology* 7(4), 278 - 80
- Robertson S.J., Ennion S.J., Evans R.J. und Edwards F.A.** (2001) Synaptic P2X receptors. *Current Opinion in Neurobiology* 11, 378 - 86
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn T., Mullis K.B. und Erlich H. A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487 - 91
- Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T.** (1989) Molecular Cloning – A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Sanger F.S., Nicklen S. und Coulson A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74(12), 5463 - 7
- Schägger H.** (2001) Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol.* 65, 231 - 44
- Schägger H.** (1996) Electrophoretic techniques for isolation and quantification of oxidative phosphorylation complexes from human tissues. *Methods in Enzymology* 264, 555 - 66
- Schägger H.** (1995) Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes. *Methods in Enzymology* 260, 190 - 202
- Schägger H., Cramer W.A. und von Jagow G.** (1994a) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 217(2), 220 - 30
- Schägger H. und von Jagow G.** (1994b) A practical guide to membrane protein purification. *Academic Press*, 81 - 102
- Schägger H. und von Jagow G.** (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* 199(2), 223 - 31

- Schrag J.D., Bergeron J.J.M., Li Y., Borisova S., Hahn M., Thomas D.Y. und Cygler M.** (2001) The structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Molecular Cell* 8, 633 - 44
- Scott D.B., Blanpied T.A., Swanson G.T., Zhang C. und Ehlers M.D.** (2001) An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *The Journal of Neuroscience* 21(9), 3063 - 72
- Sebastiao A.M. und Ribeiro J.A.** (2000) Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol.Sci.* 21, 341 - 6
- Semenza G.** (1986) Anchoring and biosynthesis of stalked brush border membrane proteins: glycosidases and peptidases of enterocytes and renal tubuli. *Annu Rev Cell Biol* 2, 255 - 313
- Shi J.D., Kukar T., Wang C.Y., Li Q.Z., Cruz P.E., Davoodi-Semiromi A., Yang P., Gu Y., Lian W., Wu D.H. und She J.X.** (2001) Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). *The Journal of Biological Chemistry* 276(20), 17474 - 8
- Smith T.M., Carl S.A. und Kirley T.L.** (1998B) Immunological detection of ecto-ATPase in chicken and rat tissues: characterization, distribution, and a cautionary note. *Biochem Mol Biol Int.* 45(5), 1057 - 66
- Smith T.M. und Kirley T.L.** (1999A) Site-directed mutagenesis of a human brain ecto-apyrase: evidence that the E-type ATPases are related to the actin/heat shock 70/sugar kinase superfamily. *Biochemistry* 38(1), 321 - 8
- Smith T.M. und Kirley T.L.** (1999B) Glycosylation is essential for functional expression of a human brain ecto-apyrase. *Biochemistry* 38(5), 1509 - 16
- Smith T.M. und Kirley T.L.** (1998A) Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1386(1), 65 - 78
- Spector T.** (1978) Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. *Analalytical Biochemistry* 86(1), 142 - 6.
- Tanaka Hall T.M.** (2002) Poly(A)tail sunthesis and regulation: recent structural insights. *Current Opinion in Structural Biology* 12, 82 - 8
- Teintze M., Arzimanoglou I.I., Lovelace C., Xu Z. und Rigas B.** (1995) RecA-assisted rapid enrichment of specific clones from model libraries. *Biochem and Biophys. Res. Comm.* 211(3), 804 - 11

- Thompson J.A., Lau A.L. und Cunningham D.D.** (1987) Selective radiolabeling of cell surface proteins to a high specific activity. *Biochemistry* 26(3), 743 - 50
- Thompson J.D., Higgins D.G. und Gibson T.J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673 - 80
- Toma L., Pinhal M.A.S., Dietrich C.P., Nader H.B. und Hirschberg C.B.** (1996) Transport of UDP-Galactose into the golgi lumen regulates the biosynthesis of proteoglycans. *The Journal of Biological Chemistry* 271(7), 3897 - 901
- Trombetta E.S. und Helenius A.** (2000) Conformational requirements for glycoprotein reglucosylation in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology* 148(6), 1123 – 29
- Trombetta E.S. und Helenius A.** (1999) Glycoprotein reglucosylation and nucleotide sugar utilization in the secretory pathway: identification of a nucleoside diphosphatase in the endoplasmic reticulum. *The EMBO Journal* 18(12), 3282 - 92
- Valenzuela J.G., Charlab R., Galperin M.Y. und Ribeiro J.M.C.** (1998) Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug *Cimex lectularius*. A new type of a nucleotide-binding enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 273(46), 30583 – 90
- Valenzuela J.G., Belkaid Y., Rowton E. und Ribeiro J.M.C** (2001) The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel *Cimex* family of apyrases. *The Journal of Experimental Biology* 204, 229 - 37
- Vollmayer P., Koch M., Braun N., Heine P., Servos J., Israr E., Kegel B. und Zimmermann H.** (2001) Multiple ecto-nucleotidases in PC12 cells: identification and cellular distribution after heterologous expression. *J Neurochem.* 78(5), 1019 - 28
- Wang T.F. und Guidotti G.** (1998A) Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry* 273(18), 11392-9
- Wang T.F. und Guidotti G.** (1998B) Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. *Brain Research* 790(1-2), 318 – 22
- Wang T.F. und Guidotti G.** (1996) CD39 is an ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-apyrase. *The Journal of Biological Chemistry* 271(17), 9898 - 901

- Wang T.F., Ou Y. und Guidotti G.** (1998C) The transmembrane domains of ectoaprase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure. *The Journal of Biological Chemistry* 273(38), 24814 - 21
- Wang T.F., Rosenberg P.A. und Guidotti G.** (1997) Characterization of brain ectoaprase: evidence for only one ecto-aprase (CD39) gene. *Brain Res Mol Brain Res.* 47(1-2), 295 - 302
- Xia H., Hornby Z.D. und Malenka R.C.** (2001) An ER retention signal explains differences in surface expression of NMDA and AMPA receptor subunits. *Neuropharmacology* 41, 714 - 23
- Yamashita K., Hara-Kuge S. und Ohkura T.** (1999) Intracellular lectins associated with N-linked glycoprotein traffic. *Biochimica et Biophysica Acta* 1473, 147 - 60
- Yeung G., Mulero J.J., McGowan D.W., Bajwa S.S. und Ford J.E.** (2000) *CD39L2*, a gene encoding a human nucleoside diphosphatase, predominantly expressed in the heart. *Biochemistry* 39, 12916 – 23
- Zerangue N., Schwappach B., Jan Y.N. und Jan, L.Y.** (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 22, 537 - 48
- Zhang F.L., Luo L., Gustafson E., Palmer K., Qiao X., Fan X., Yang S., Laz T.M., Bayne M. und Monsma Jr. F.** (2002) P2Y₁₃: identification and characterization of a novel G_{ai}-coupled ADP receptor from human and mouse. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 301, 705 - 713
- Zhong X. und Guidotti G.** (1999) A yeast Golgi E-type ATPase with an unusual membrane topology. *The Journal of Biological Chemistry* 274(46). 32704 - 11
- Zhong X., Malhotra R., Woodruff R. und Guidotti G.** (2001) Mammalian plasma membrane ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, CD39, is not active intracellularly. The N-glycosylation state of CD39 correlates with surface activity and localization. *The Journal of Biological Chemistry* 276(44), 41518 - 25
- Zinchuk V.S., Okada T., Kobayashi T. und Seguchi H.** (1999) Ecto-ATPase activity in cerebellum: implication to the function of synaptic transmission. *Brain Research* 815, 111 - 5
- Zimmermann H.** (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362(4-5), 299 - 309

- Zimmermann H.** (1999) Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol Sci.* 20(6), 231 - 6
- Zimmermann H.** (1996) Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 49(6), 589 - 618
- Zimmermann H.** (1994) Signalling via ATP in the nervous system. *Trends in Neuroscience.* 17(10), 420 - 6
- Zimmermann H. und Braun N.** (1999) Ecto-nucleotidases--molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. *Progress in Brain Research* 120, 371 - 85
- Zimmermann H. und Braun N.** (1996) Extracellular metabolism of nucleotides in the nervous system. *J Auton Pharmacol.* 16(6), 397 - 400
- Zimmermann H., Braun N., Allgaier C. und Illes P.** (1998A) Nukleotide, eine neue Klasse extrazellulärer Signalstoffe im Nervensystem. *Neuroforum* 1, 148 - 57
- Zimmermann H., Braun N., Kegel B. und Heine P.** (1998B) New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. *Neurochemistry International* 32(5-6), 421 – 5
- Zuber C., Fan J.Y., Guhl B., Parodi A., Fessler J.H., Parker C. und Roth J.** (2001) Immunolocalization of UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase indicates involvement of pre-golgi intermediates in protein quality control. *PNAS* 98(19), 10710 - 5

A.3 pNKS2/rnNTPDase1 (4448 bp)

```

1 aagcttggta ccgagctcgg atccactagt aacggccgccc agtgtgctgg aattcggcac
61 gagatggctg gaaagttagt gtcactgggt ccacccctgc tgctggctgc cgccgggcctc
121 accggccttc tgctactttg cgtccctacc caagacgtcc gggagccgccc cgccctcaag
181 tacggcattg tcctggatgc gggctcttca cacacatcca tgtttgtcta caagtggcca
241 gcggacaagg agaatgacac aggcacgtg ggccagcaca gctcttgtga tgttcaagggt
301 ggtggcatct ccagctatgc aaatgacccc tctaaggcag gccagagtct ggtccgatgc
361 cttgagcagg cccttcggga tgtaccaga gacagacatg ctacacacac actctacctg
421 ggagctacag caggcatgcg cccgttcaac ctgaccagcc cagaggccac agccagggtg
481 cttgagggcag tgacacagac gctcacacag tacccctttg acttccgtgg tgctcgcac
541 ctctcgggac aggatgaagg ggtgtttggc tgggtgactg ccaactacct gctggagaac
601 ttcacaaagt atggctgggt gggccggtgg atacggccaa ggaagggaac actgggggcc
661 atggaccttg ggggtgcttc gacacagatc acctttgaga caaccagtcc ctctgaagat
721 ccaggcaacg aggttcattt gcgactctat ggccagcatt accgcgttta cacacatagc
781 ttctctgct atggccgaga ccagattctc ctgaggcttc tggccagtgc cctccagatc
841 catcgcttcc acccctgctg gccaaagggc tactctaccc aagtgtgctc ccaggaagtc
901 taccagtgcg catgcacgat ggtcagcgt ccccgggcct tcaatggcag tgccatcgct
961 agcctgtcag gaaccagcaa tgctaccctg tgtcgtgacc tgcgtctcgc gctcttcaac
1021 atctcctcct gccctttttc ccaatgctcc ttcaatgggg tcttccagcc tcccgtggct
1081 ggaaacttca tagccttttc tgctttctac tatactgtgg acttcttgac aacagtgatg
1141 gggctgcctg tgggaaccct gaagcagctg gaggaagcca cagagatcac ctgcaaccag
1201 acatggactg aacttcaggc ccgagtgccg ggacaaaaga cccgcctggc tgactactgt
1261 gctgtagcca tgttcataca tcagcttctg agccgtgggt accacttcca tgagcgctcc
1321 ttcagagaag tggctctcca aaagaaggct gcagacacgg ctgtcggctg ggcgtgggc
1381 tacatgctga atttgactaa cctgattcct gccgacctcc ccggactacg caagggcacc
1441 cacttcagct cctgggtcgc tctcctgctg ctcttcacag tcttgatctt ggcggcgctg
1501 gtctgtctcc tgcgccaggt gcgttctgcc aagtctccag gcgcctctca ggggtgaact
1561 gggagcctct cccaactccc tactatccct cccttcacaga gggcatctct gaccctgaag
1621 cagcctggaa accaacgttc cctatctaca ttcacagaaa gcctacgtgg gcagccctga
1681 gttctcaatt aatcctcctc tctcttctca ggatgtcagg tctcagcctg tgactcaggg
1741 tgaggctccat tcggagtggg acttttggctc tgatcttcag ggcctctcag cgaggtcgac
1801 gtagctttca tttgttttaa tttatttttt aaatagcatt acaaaaacaa ttaccacaac
1861 aaaaaaaaaa ccaaaaacaa aacaaataat aaagtcccaa acaaaaaaac gaatatgcaa
1921 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagaattct
1981 agagcggcgg ccaccgcggt ggccgggtac cgaattccgg tctccctata gtgagtcgta
2041 ttactggcgt aatagcgaag aggcccgcac cgatcgccct tcccaacagt tgcgtagcct
2101 gaatggcgaa tgggacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg tgggtggtac
2161 gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgccc gctcctttcg cttctttccc
2221 ttcctttctc gccacgttgc ccggttttcc ccgtcaagct ctaaatcggt ggtccctttt
2281 agggttccga tttagtgtt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt aggggtgatg
2341 ttacagtggt ccacgcctc gatagcgggt ttttcgcctt ttgacgttgg agtccacgtt
2401 cttaaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cgttctattc
2461 ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctatttg ttaaaaaatg agctgattta
2521 acaaaaattta acgcgaattt taacaaataa ttaacgttta caattttagg tggcattttt
2581 cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat
2641 ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg
2701 agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttccgtgt
2761 tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga
2821 gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa
2881 gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt
2941 attgacgccc ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttgggt
3001 gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc
3061 agtgttgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga
3121 ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat
3181 cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct
3241 gttagcaatg caacaacgtt gcgcaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc
3301 cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgtcgc
3361 gcccttcggc ctggctgggt tattgtgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc
3421 ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg
3481 acggggagtc aggcactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca
3541 ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta
3601 aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc
3661 aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa
3721 ggaatctctt gagatccctt tttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca
3781 ccgctaccag cgttggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta

```

```

3841 actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc
3901 caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca
3961 gtggctgctg ccagtggcga taagtgcgtg cttaccgggt tggactcaag acgatagtta
4021 ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag
4081 cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc attgagaaaag cgccacgctt
4141 cccgaaggga gaaaggcgga caggatatcg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc
4201 acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac
4261 ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac
4321 gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc
4381 tttcctgcgt tatcccttga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat
4441 accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgaaga agcgaagag
4501 cgcccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagtaataca
4561 taaccttatg tatcatacac atacgattta ggtgacacta tagaatac

```

A.4 pNKS2/His₆rnNTPDase1 (4453 bp)

```

1 aagcttcaac aaacaacaaa gtccgacgtc gaagtagcca ccatggcaca ccaccaccac
61 caccacatgg ctggaaagtt ggtgtcactg gtgccacccc tgctgctggc tgccgcgggc
121 ctcaccggcc ttctgtctact ttgcgtccct acccaagacg tccgggagcc gcccgccctc
181 aagtacggca ttgtcctgga tgcgggctct tcacacacat ccatgtttgt ctacaagtgg
241 ccagcgggaca aggagaatga cacaggcatc gtgggcccagc acagctcttg tgatgttcaa
301 ggtggtggca tctccagcta tgcaaatgac ccctctaagg caggccagag tctggtccga
361 tgccttgagc aggcccttcg ggatgtaccc agagacagac atgctagcac accactctac
421 ctgggagcta cagcaggcat gcgcccgttc aacctgacca gccagaggc cacagccagg
481 gtgcttgagg cagtgcacac gacgtcaca cagtaccctt ttgacttcgc tgggtctcgc
541 atcctctcgg gacaggatga aggggtgttt ggctgggtga ctgccaaacta cctgctggag
601 aacttcatca agtatggctg ggtgggcccgc tggatacggc caaggaaggg aacactgggg
661 gcaatggacc ttgggggtgc ttgcacacag atcacctttg agacaaccag tccctctgaa
721 gatccaggca acgaggttca tttgcgactc tatggccagc attaccgcgt ttacacacac
781 agcttctctt gctatggcgc agaccagatt ctctgaggc ttctggccag tgccctccag
841 atccatcgct tccacccctg ctggccaaag ggctactcta cccaagtgtc gctccaggaa
901 gtctaccagt cgccatgcac gatgggtcag cgtccccggg ccttcaatgg cagtgccatc
961 gtacgcctgt caggaaccag caatgctacc ctgtgtcgtg acctcgtctc tcggtcttct
1021 aacatctcct cctgccccct ttcccaatgc tccctcaatg gggctcttca gcctcccgtg
1081 gctggaaact tcatagcctt ttctgctttc tactatactg tggacttctt gacaacagtg
1141 atggggctgc ctgtgggaac cctgaagcag ctggaggaag ccacagagat cactgcacac
1201 cagacatgga ctgaacttca ggcccagtg ccaggacaaa agaccgcct ggctgactac
1261 tgtgctgtag ccatgttcat acatcagctt ctgagccgtg gttaccactt cgatgagcgc
1321 tccttcagag aagtggctct ccaaaagaag gctgcagaca cggctgtcgg ctgggcgctg
1381 ggctacatgc tgaatttgac taacctgatt cctgccgacc tccccggact acgcaagggc
1441 acccaattca gctcctgggt cgctctcctg ctgctcttca cagtcctgat cttggcggcg
1501 ctggtcctgc tcctgcgcca ggtgcgttct gccaaagtct caggcgccct ctagggtga
1561 actgggagcc tctcccaact ccctactatc cctcccttcc agagggcac tcctgacctg
1621 aagcagcctg gaaaccaacg ttccctatct acattcacag aaagcctacg tgggcagccc
1681 tgagtcttca attaatcctc ctctctcttc ctaggatgtc aggtctcagc ctgtgactca
1741 ggtgaggtc cattcggagt gggacttttg ttctgatctt cagggccccc cctcgaggtc
1801 gacgtagctt tcatttgttt taattttatt tttaaatagc attacaaaaa aaattaccac
1861 aacaaaaaaa aaacaaaaaa aaaaacaaat aataaagtcc caaaacaaaa acggaatatg
1921 caaacaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaat
1981 tctagagcgg ccgccaccgc ggtggccggg taccgaattc cgttctcctt atagttagtc
2041 gtattactgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgtag
2101 cctgaatggc gaatgggacg cgccctgtag cggcgcatca agcggcggg gtgtgggtgg
2161 tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg ccgctcctt tcgctttctt
2221 cccttctctt ctgcgccagt tcgcgggctt tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc
2281 tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attagggtga
2341 tgggtcacgt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt tggagtcac
2401 gttctttaat agtggactct tgttccaaac tggacaacaa ctcaacccta tctcggctca
2461 ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat ttccgcctat tgggttaaaaa atgagctgat
2521 ttaacaaaaa ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgt ttacaatttc aggtggcact
2581 tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt tctaaatata ttcaaatatg
2641 tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt
2701 atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttctt
2761 gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca

```

```

2821 cgagtggggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc
2881 gaagaacggtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc
2941 cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg gcgcgcatac actattctca gaatgacttg
3001 gttgagtact caccagtcac agaaaagcat ctacggatg gcatgacagt aagagaatta
3061 tgcagtgtcg ccataacctat gagtgataac actgcgggcca acttacttct gacaacgatac
3121 ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt
3181 gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg
3241 cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct
3301 tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaaag ttgcaggacc acttctgcgc
3361 tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccgggtga gcgtgggtct
3421 cgcggtatca ttgcagcact ggggccaagt ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac
3481 acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc
3541 tctactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat
3601 ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg
3661 accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccgat agaaaagatc
3721 aaaggatcct cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa
3781 ccaccgtac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttcggaag
3841 gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta
3901 ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta
3961 ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggaact aagacgatag
4021 ttaccggata agcgcagcgc gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg
4081 gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agcattgaga aagcgccacg
4141 cttcccgaag ggagaaaggg ggacaggtat ccggtaaagc gcagggctcg aacaggagag
4201 cgacagagg agcttcacag gggaaacgcc tggtatcttt atagtctgt cgggtttcgc
4261 cactctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgcctcgtcag gggggcggag cctatggaaa
4321 aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg
4381 ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct
4441 gataccgctc gccgcagccg aacgacccag cgcagcagat cagttagcga ggaagcggaa
4501 gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagtaat
4561 acataacctt atgtatcata cacatacgat ttaggtgaca ctatagaata c

```

A.5 pNKS2/rnNTPDase2 (4608 bp)

```

1 aagcttggta ccgagctcgg atccactagt aacggccgccc agtgtgtctgg aattcggcac
61 gagatggctg gaaagtgtgt gtcactgggt ccacccctgc tgctggctgc cgcgggcctc
121 accggccttc tgctactttg cgtccctacc caagacgtcc gggagccgccc cgccctcaag
181 tacggcattg tcctggatgc gggctcttca cacacatcca tgtttgtcta caagtggcca
241 gcggacaagg agaatgacac aggcacgtg ggccagcaca gctcttgtga tgttcaaggt
301 ggtggcatct ccagctatgc aaatgacccc tctaaggcag gccagagtct ggtccgatgc
361 cttgagcagg cccttcggga tgtacccaga gacagacatg ctagcacacc actctacctg
421 ggagctacag caggcatgcg cccgttcaac ctgaccagcc cagaggccac agccaggggtg
481 cttgaggcag tgacacagac gctcacacag tacccttttg acttcctgtg tgctcgcac
541 ctctcgggac aggatgaagg ggtgtttggc tgggtgactg ccaactacct gctggagaac
601 ttcacatcaagt atggctgggt gggccggtgg atacggccaa ggaagggaac actgggggccc
661 atggaccttg ggggtgcttc gacacagatc acctttgaga caaccagtcc ctctgaagat
721 ccaggcaacg aggttcattt gcgactctat ggccagcatt accgcgttta cacacatagc
781 ttctctctgt atggccgaga ccagattctc ctgaggcttc tggccagtgc cctccagatc
841 catcgcttcc acccctgctg gccaaagggc tactctaccc aagtgtctgt ccaggaagtc
901 taccagtcgc catgcacgat ggtcagcgt ccccgggcct tcaatggcag tgccatcgct
961 agcctgtcag gaaccagcaa tgcctaccctg tgcctgtgacc tcgtctctcg gctcttcaac
1021 atctcctcct gcccttttcc ccaatgctcc ttcaatgggg tcttccagcc tcccgtggct
1081 ggaacttca tagccttttc tgctttctac tatactgtgg acttctgtac aacagtgatg
1141 gggctgcctg tgggaaccct gaagcagctg gaggaagcca cagagatcac ctgcaaccag
1201 acatggactg aacttcaggc ccgagtgcga ggacaaaaga cccgcctggc tgactactgt
1261 gctgtagcca tgttcataca tcagcttctg agccgtgggt accacttcca tgagcgctcc
1321 ttcagagaag tggctcttcca aaagaaggcg gcagacacgg ctgtcggctg ggcgtgggc
1381 tacatgctga atttgactaa cctgattcct gccgacctcc ccggactacg caagggcacc
1441 cacttcagct cctgggtcgc tctcctgctg ctcttcacag tctgtactct ggcgcgctg
1501 gtctgtctcc tgcgccaggt gcgttctgcc aagtctccag gcgcctctta ggggtgaact
1561 gggagcctct cccaactccc tactatccct cccttccaga gggcatctct gaccctgaag
1621 cagcctggaa accaacgttc cctatctaca ttacagaaa gcctacgtgg gcagccctga
1681 gttctcaatt aatcctcttc tctcttctta ggaatgcagg tctcagcctg tgactcagg
1741 tgagggtccat tcggagtggg acttttgttc tgatcttcag ggccccccct cgagggtcgac

```

```

1801 gtagctttca tttgttttaa tttatTTTT aaatagcatt acaaaacaaa ttaccacaac
1861 aaaaaaaaaa ccaaaacaaa aacaaataat aaagtcccaa aacaaaaaac gaatatgcaa
1921 acaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagaattct
1981 agagcggcgg ccaccgcggt ggccgggtac cgaattccgg tctccctata gtgagtcgta
2041 ttaactggcg aatagcgaag aggcccgcac cgatcgccct tcccaacagt tgcgtagcct
2101 gaatggcgaa tgggacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg tgggtggttac
2161 gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcggcc gtccttttcg ctttcttccc
2221 ttcttttctc gccacgttcg ccggttttcc ccgtcaagct ctaaatacgg ggctcccttt
2281 agggttccga tttagtgcct tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt aggggtgatg
2341 ttcacgtggg ccactgcgcc gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacggt
2401 ctttaatagt ggactcctgt tccaaactgg aacaacactc aacctatctt cgtctatttc
2461 ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggctatttgg ttaaaaaatg agctgattta
2521 acaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta caatttcagg tggcactttt
2581 cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatTTTTct aaatacattc aaatatgtat
2641 ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg
2701 agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt ccctTTTTtg cggcattttg ccttccctgt
2761 tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcaga
2821 gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa
2881 gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggg attatcccg
2941 attgacgccg ggcaagagca actcggctgc cgcatacact attctcagaa tgacttgggt
3001 gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc
3061 agtgcctgca taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga
3121 ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat
3181 cgttggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac caggtatgct
3241 gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc
3301 cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagtgt caggaccact tctgcgctcg
3361 gcccttccgg ctggtctggt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc
3421 ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg
3481 acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca
3541 ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta
3601 aaacttcatt tttaatTTaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc
3661 aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa
3721 ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca
3781 ccgctaccag cggtggtttg tttgcgggat caagagctac caactctttt tccgaaggta
3841 actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc
3901 caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaag cctgttacca
3961 gtggctgctg ccagtggcga taagtctgtt cttaccgggt tggactcaag acgatatgta
4021 ccgataaagg cgacgcggtc gggtctgaac gggtgttcgt gcacacagcc cagcttgag
4081 cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc attgagaaag gcgccagctt
4141 cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggcgggaac aggagagcgc
4201 acgaggggag ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtccgtgcgg gtttcgccac
4261 ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggccggagcct atggaaaaac
4321 gccagcaacg cggccttttt acggttccgt gccttttTgt ggcttttTgc tcacatgttc
4381 tttcctcggt tatccctgta ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat
4441 accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag
4501 cgcccaatac gaaaaccgcc tctcccgcgc cgttgccga ttcattaatg cagtaataca
4561 taaccttatg tatcatcac atacgattta ggtgacacta tagaatac

```

A.6 pNKS2/His₆-rnNTPDase2 (4611 bp)

```

1 aagcttcaac aaacaacaaa gtccgacgtc gaagtagcca ccatggcaca ccaccaccac
61 caccacatgg ctggaaagtt ggtgtcactg gtgccacccc tgctgctggc tgccgcgggc
121 ctaccgggcc ttctgctact ttgcgtccct acccaagacg tccgggagcc gcccgccctc
181 aagtacggca ttgtcctgga tgcgggctct tcacacacat ccatgtttgt ctacaagtgg
241 ccagcggaca aggagaatga cacaggcatc gtgggccagc acagctcttg tgatgttcaa
301 ggtggtggca tctccagcta tgcaaatgac ccctctaagg caggccagag tctgttccga
361 tgccttgagc aggcccttcg ggatgtaccc agagacagac atgctagcac accactctac
421 ctgggagcta cagcaggcat gcgccggttc aacctgacca gccagaggc cacagccagg
481 gtgcttgagg cagtgcacac gacgctcaca cagtaccctt ttgacttccg tgggtgctcg
541 atcctctcgg gacaggatga aggggtgttt ggctgggtga ctgccaaact cctgctggag
601 aacttcatca agtatggctg ggtgggcccg ttgatacggc caaggaaggg aacactgggg
661 gcaatggacc ttgggggtgc ttcgacacag atcacctttg agacaaccag tcctctgaa
721 gatccaggca acgaggttca tttgcgactc tatggccagc attaccgcgt ttacacacat

```



```

781 agcttctctt gctatggccg agaccagatt ctcttgaggc ttctggccag tgccctccag
841 atccatcgct tccacccctg ctggccaaag ggctactcta cccaagtgcg gctccaggaa
901 gtctaccagt cgccatgcac gatgggtcag cgtccccggg ccttcaatgg cagtgccatc
961 gtcagcctgt caggaaccag caatgctacc ctgtgtcgtg acctcgtctc tcggctcttc
1021 aacatctcct cctgcccctt ttcccgaatg tccttcaatg gggctctcca gctcccgtg
1081 gctggaaact tcatagcctt ttctgctttc tactatactg tggacttctt gacaacagtg
1141 atggggctgc ctgtgggaac cctgaagcag ctggaggaag ccacagagat cacctgcaac
1201 cagacatgga ctgaacttca ggcccgagtg ccaggacaaa agaccgcgct ggctgactac
1261 tgtgctgtag ccatgttcat acatcagcct ctgagccgtg gttaccactt cgatgagcgc
1321 tccttcagag aagtggctct ccaaaagaag gctgcagaca cggctgtcgg ctgggcgctg
1381 ggctacatgc tgaatttgac taacctgatt cctgcgcacc tcccggactc aacgaaggc
1441 acccacttca gctcctgggt cgctctcctg ctgctcttca cagtctgat ctggcgggcg
1501 ctggctctgc tcctgcgcca ggtgcgttct gccaaagtct caggcgccct ctagggggtga
1561 actgggagcc tctcccaact ccctactatc cctcccttcc agagggcatc tctgaccctg
1621 aagcagcctg gaaaccaacg ttccctatct acattcacag aaagcctacg tgggcagccc
1681 tgagtcttca attaatcctc ctctctcttc ctaggatgtc aggtctcagc ctgtgactca
1741 gggtgaggtc cattcggagt gggacttttg ttctgatctt caggggcccc cctcggagtc
1801 gacgtagctt tcatttggtt taattttatt tttaaatagc attacaaaac aaattaccac
1861 aacaaaaaaa aaacaaaaac aaaaaaacaat aataaagtcc caaaacaaaa acggaatatg
1921 caaacaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaat
1981 tctagagcgg ccgccaccgc ggtggccggg taccgaattc cgtctcctct atagttagtc
2041 gtattactgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgtag
2101 cctgaatggc gaatgggacg gcgccctgtg cggcgcatca agcgcggcgg gtgtgggtgt
2161 tacgcgcagc gtgacgccta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt
2221 cccttctctt ctgcgccagt tcgcgggctt tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc
2281 tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attagggtga
2341 tggttcacgt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc ctttgacgt tggagtccac
2401 gttctttaat agtggactct tgttccaaac tggacaaca ctcaacccta tctcgggtct
2461 ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat ttccggcctat tggttaaaaa atgagctgat
2521 ttaacaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgt ttacaatttc aggtggcact
2581 tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatct tgtttatttt tctaaatata ttcaaatatg
2641 tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt
2701 atgagtattc aacatttccg tgtcgcctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttctt
2761 gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca
2821 cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tcttgagag ttttcgcccc
2881 gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagtctctg tatgtggcgc ggtattatcc
2941 cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatac actattcttc gaatgacttg
3001 gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta
3061 tgcagtgtcg ccataaccat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgata
3121 ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt
3181 gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaaac acgagcgtga caccacgatg
3241 cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct
3301 tcccggcaac aattaataga ctggatggag cgggataaag ttgcaggacc actcttgccg
3361 tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga cgtgggtct
3421 cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac
3481 acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gatagggtgc
3541 tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat
3601 ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg
3661 accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccg t agaaaagatc
3721 aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaactc gctgcttgca aacaaaaaaa
3781 ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc taccactct ttttcggaag
3841 gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta
3901 ggccaccact tcaagaactc ttagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta
3961 ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggaactc aagacgatag
4021 ttaccgggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt ctgacacaca gccagcttg
4081 gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agcattgaga aagcggcacg
4141 cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggat cgggtaagcg gcagggtcgg aacagagag
4201 cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc
4261 cacctctgac ttgagcgtcg atttttgta tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa
4321 aacgccagca acgcggcctt ttacgggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg
4381 ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct
4441 gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagttagcga ggaagcggaa
4501 gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagtaat
4561 acataacctt atgtatcata cacatacag ttaggtgaca ctatagaata c

```

A.7 BN-PAGE Proteinmarker

Laufverhalten der Markerproteine in der BN-PAGE :

Ferritin (Dimer)	900 kD
Ferritin	450 kD
Catalase	240 kD
Aldolase	158 kD
BSA (Dimer)	136 kD
BSA (Monomer)	68 kD
Ovalbumin	45 kD

A.8 PROSITE-Syntax

The PROSITE syntax used :

- The **standard IUPAC one-letter codes**.
- **`x'** : **any** amino acid is accepted at the position.
- **`[]'** : residues indicated in square parentheses are those **allowed** at the position.
- **`{'** : residues indicated in curly brackets are those **forbidden** at the position.
- **`()'** : **repetition** of a pattern element are indicated in parenthesis. The number of repetition is indicated by a number or two number separated by a ','.
- **`-'** : **separates** each pattern element.
- **`<'** : indicated a **N-terminal restriction** of the pattern.
- **`>'** : indicated a **C-terminal restriction** of the pattern.
- **`.'** : the period **ends** the pattern.

LEBENS LAUF

Name:	Bernd Uwe Failer
geboren:	30. Mai 1969 in Darmstadt
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet
Adresse:	Am Buchrain 40 63322 Rödermark
1975 – 1982	Grundschule Schillerschule in Darmstadt
1982 – 1989	Gymnasium Eleonorenschule in Darmstadt
1985 – 1989	Tätigkeit beim Heim-Verlag in Darmstadt-Eberstadt; Layout der Computerzeitschriften Atari ST und Amiga Kickstart, organisatorische Betreuung und Layout von Fachbüchern,
Okt. 1989	Beginn des Studiums im Fachbereich Chemie an der TU-Darmstadt
1991	Werksstudent bei der Firma Merck KGA in Darmstadt
1992	Vordiplom im Fachbereich Chemie an der TU-Darmstadt
1993 – 1994	Tätigkeit in der Entwicklungsabteilung der Somos GmbH in Weiterstadt; Trocknungsversuche von Kunststoffgranulaten zur Verfahrensoptimierung, Restfeuchteanalysen
1995 – 1997	Mitarbeit im elterlichen Betrieb in Groß-Zimmern
Jan. 1999	Diplom im Fachbereich Chemie der TU-Darmstadt, Diplomarbeit am Institut für Biochemie bei Prof. Dr. H.G. Gassen, Thema der Arbeit: „Charakterisierung der Promotorregion I des hirnspezifisch exprimierten Gens 83.5“
Apr. 1999 – Dez. 2002	Dissertation an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Zoologisches Institut, Abteilung Neurochemie bei Prof. Dr. H. Zimmermann, Thema der Arbeit: „Molekulare und funktionelle Charakterisierung von Nukleotid-hydrolysierenden Enzymen des Endomembransystems und der Zelloberfläche“